

HCV SPEZIFISCHE CD4+ T-LYMPHOZYTEN  
SERONEGATIVER EXPONIERTER EHEPARTNER  
CHRONISCH INFIZIERTER HCV PATIENTEN  
ALS TEIL EINER MÖGLICHEN  
PROTEKTIVEN IMMUNITÄT

von

Dominique Tomlinson

Aus der  
Medizinischen Klinik und Poliklinik II Großhadern  
der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Burkhard Göke

**HCV spezifische CD4+ T-Lymphozyten seronegativer exponierter  
Ehepartner chronisch infizierter HCV Patienten als Teil einer möglichen  
protektiven Immunität**



Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Dominique Katrin Victoria Tomlinson

aus  
Frankfurt am Main

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Helmut Diepolder

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. Reinhart Zachoval

Priv. Doz. Dr. Veit Gülberg

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:

Dr. med. Bijan Raziorrouh

Dekan:

Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung:

09. Januar 2014

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	HEPATITIS C – ENTDECKUNG UND EPIDEMIOLOGIE .....	1
1.2	DAS HEPATITIS-C-VIRUS .....	3
1.2.1	<i>Genom</i> .....	3
1.2.2	<i>Struktur- und Nichtstrukturproteine</i> .....	4
1.2.3	<i>Genotypen</i> .....	5
1.2.4	<i>Lebenszyklus</i> .....	6
1.3	ÜBERTRAGUNGSWEGE.....	7
1.4	IMMUNOLOGIE DER HEPATITIS-C-VIRUS-INFEKTION .....	10
1.5	DIAGNOSTIK DER HCV INFEKTION .....	14
1.6	KLINISCHER VERLAUF UND THERAPEUTISCHE MÖGLICHKEITEN DER HEPATITIS-C-VIRUS-INFEKTION ..	14
1.7	ZIELSETZUNG .....	18
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>20</b>
2.1	MATERIAL .....	20
2.1.1	<i>Probandengruppen</i> .....	20
2.1.1.1	Normalpersonen .....	20
2.1.1.2	Probanden mit spontan ausgeheilter akuter Hepatitis C.....	21
2.1.1.3	Exponierte Probanden .....	23
2.1.1.4	Chronisch infizierte Ehepartner.....	24
2.1.2	<i>Gruppengröße</i> .....	25
2.1.3	<i>Allgemeiner Laborbedarf</i> .....	26
2.1.4	<i>Geräte</i> .....	27
2.1.5	<i>Chemikalien</i> .....	27
2.1.6	<i>Lösungen</i> .....	28
2.1.7	<i>Medien</i> .....	28
2.1.8	<i>Antikörper</i> .....	29
2.1.9	<i>Tetramere</i> .....	29
2.1.10	<i>Proteine</i> .....	30
2.1.11	<i>Peptide</i> .....	30
2.2	METHODEN.....	31
2.2.1	<i>Isolierung von PMBC aus Blut</i> .....	31
2.2.2	<i>Bestimmung der Zellzahl</i> .....	31
2.2.3	<i>Kryokonservierung von Zellen</i> .....	31
2.2.4	<i>Rekultivierung von kryokonservierten Zellen</i> .....	32
2.2.5	<i>Lymphozytäre CD154 Expression und IFN<math>\gamma</math>-Sekretion nach 15-stündiger Antigenstimulation</i> .....	32
2.2.5.1	Prinzip .....	32
2.2.5.2	Ansatz .....	33
2.2.5.3	Auswertung .....	33
2.2.6	<i>Proliferationsassay mit Carboxyfluorescein-Diacetate Succinimidylester (CFSE)</i> .....	35



2.2.6.1	Prinzip des CFSE Proliferationsassays.....	35
2.2.6.2	Ansatz des CFSE Proliferationsassays .....	35
2.2.6.3	Auswertung .....	36
2.2.7	<i>14-tägige Zellkultur mit anschließender Restimulation durch feeder-Zellen zur Messung der lymphozytären IFN<math>\gamma</math> Antwort.....</i>	37
2.2.7.1	Prinzip .....	37
2.2.7.2	Ansatz .....	38
2.2.7.3	Auswertung .....	39
2.2.8	<i>14-tägige Zellkultur mit HLA Klasse-II-Tetramerfärbung .....</i>	40
2.2.8.1	Prinzip .....	40
2.2.8.2	Ansatz .....	41
2.2.8.3	Auswertung .....	42
2.2.9	<i>Durchflusszytometrie .....</i>	44
2.2.9.1	Auswertung der durchflusszytometrischen Daten.....	45
2.2.10	<i>Statistik.....</i>	47
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>49</b>
3.1	AKTIVIERUNG VON T-LYMPHOZYTEN NACH <i>IN VITRO</i> STIMULATION MIT HCV PROTEINEN .....	49
3.1.1	<i>Expression von CD154 in T-Zellen als Antwort auf HCV Struktur- und Nichtstrukturproteine ....</i>	49
3.1.1.1	Aktivierung von CD154 auf das HCV Nichtstrukturprotein NS3 .....	54
3.1.1.2	Aktivierung von CD154 auf das HCV Nichtstrukturprotein NS4 .....	57
3.1.1.3	Aktivierung von CD154 auf das HCV Nichtstrukturprotein NS5 .....	59
3.1.1.4	IFN $\gamma$ Sekretion der CD154+ Lymphozyten auf HCV Nichtstrukturproteine .....	61
3.2	LYMPHOZYTÄRE PROLIFERATION NACH STIMULATION MIT HCV PROTEINEN.....	63
3.2.1	<i>Vergleich der Nichtstrukturproteine NS3, NS4 sowie NS5 von gesunden und HCV exponierten Probanden.....</i>	69
3.3	INTRAZELLULÄRFÄRBUNG DER INTERFERON- $\gamma$ PRODUKTION NACH 14-TÄGIGER ZELLKULTUR .....	71
3.4	HCV SPEZIFISCHE CD4+ T-LYMPHOZYTEN NACH 14-TÄGIGER ZELLKULTUR MITTELS MHC-KLASSE-II-TETRAMEREN .....	73
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>76</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>82</b>
5.1	GRUNDLAGEN UND FRAGESTELLUNG.....	82
5.2	METHODEN.....	82
5.3	ERGEBNISSE.....	83
5.4	SCHLUSSFOLGERUNG.....	83
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>85</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>91</b>
7.1	DANKSAGUNG .....	91
7.2	LEBENS LAUF .....	92

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung/Akronym	Bedeutung
ALT	Alanin-Aminotransferase
CD	Cluster of Differentiation
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
DMSO	Dimethylsulfoxid
EIA	Enzymimmunoassay
ELISPOT	Enzyme Linked Immuno Spot Technique
EMA	European Medicines Agency
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FSC	Forward Scatter
HCV	Hepatitis-C-Virus
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HDL	High Density Lipoprotein
IFN	Interferon
IL	Interleukin
i.v.	intravenös
MACS	Magnetic Cell Separation
NS	Nichtstrukturprotein
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Phosphate Buffered Saline
PHA	Phytohämagglutinin
RNA	Ribonukleinsäure
RPM	Revolutions per Minute
RPMI-1640	Zellkulturmedium
SEB	Staphylokokkenenterotoxin B
SOD	Superoxiddismutase
SSC	Sidewards Scatter
STD	Sexually Transmitted Disease
SVR	Sustained Virological Response
USA	United States of America
WHO	World Health Organization

# 1 Einleitung

## 1.1 Hepatitis C – Entdeckung und Epidemiologie

Das Genom des Hepatitis-C-Virus wurde im Jahre 1989 erstmals von Choo et al. identifiziert [1]. Es gilt als Verursacher der damals als Non-A-, Non-B-Hepatitis bezeichneten Erkrankung. Durch die Isolierung von ansteckendem Virusmaterial konnte die Nukleinsäure des Virus als positive RNA mit einer ungefähren Länge von 10000 Nukleotiden charakterisiert werden. Da Hepatitis A und B zu dieser Zeit schon bekannt waren, gaben die Autoren dem entdeckten Virus den Namen Hepatitis-C-Virus [1]. Vorhergehende Arbeiten haben das Virus bereits als bekapselt und Togavirus ähnlich beschrieben [2]. Choo und Kuo beschrieben zudem in einer weiteren Arbeit einen Assay zum Nachweis von zirkulierenden HCV Antikörpern [3].

Das Hepatitis-C-Virus überträgt sich auf dem parenteralen Weg, also beispielsweise über infizierte Blutprodukte. Dies hatte zur Folge, dass ein Großteil der Patienten durch Bluttransfusionen unwissentlich mit dem Virus angesteckt wurde. Erst mit der Entwicklung eines Testscreenings in den Jahren 1990/91 konnte dieser Ansteckungsweg zunehmend verhindert und schließlich praktisch ausgeschlossen werden. Heutzutage stellt der i.v. Drogenkonsum, neben sexueller und nosokomialer Infektion, den häufigsten Ansteckungsweg in Deutschland dar [4].

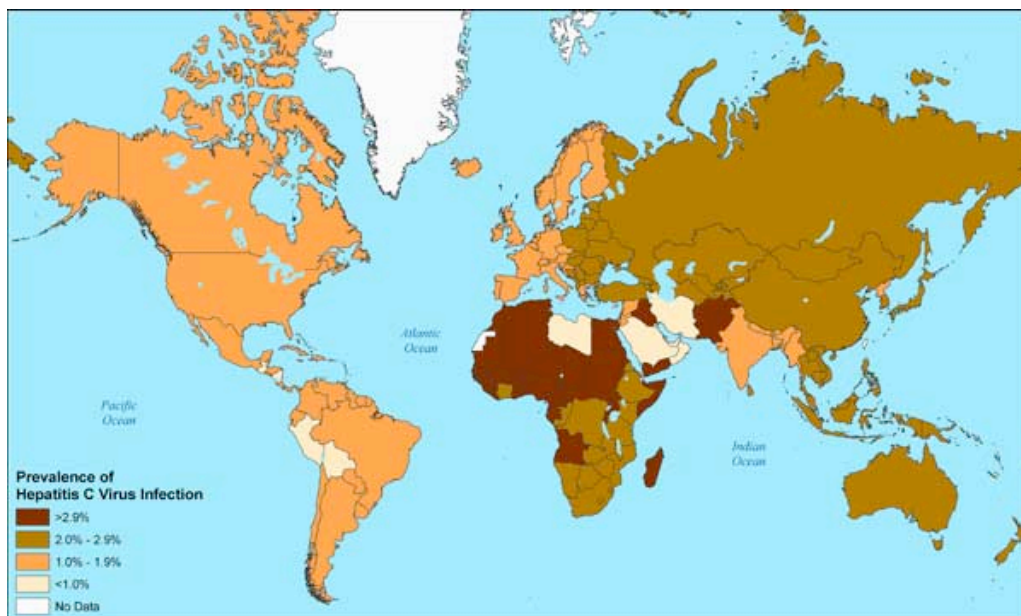


Abbildung 1.1 Darstellung der weltweiten Prävalenz der Hepatitis-C-Virus-Infektion

Quelle: [5]

Die chronische Hepatitis-C-Virusinfektion gehört heute zu den häufigsten Infektionserkrankungen weltweit.

Laut WHO Schätzungen liegt die Zahl der HCV infizierten Personen bei circa 3% der Weltbevölkerung. Von diesen gelten 170 Millionen als chronisch infiziert, davon allein 2–4 Mio. chronisch Kranke in den USA und circa 5–10 Mio. in Europa [4] [6].

In Deutschland besteht gemäß §6 des Infektionsschutzgesetzes (IfSG) für den feststellenden Arzt bei Verdacht auf beziehungsweise Erkrankung oder sogar Tod an Hepatitis C Meldepflicht. Durch die Einführung dieses Gesetzes haben sich die epidemiologischen Daten über die Verbreitung der Hepatitis C in Deutschland erheblich verbessert [4].

In der Bundesrepublik lag die Rate an Neuinfektionen im Jahre 2009 bei 6,6/100.000 Einwohnern wobei es starke regionale Unterschiede zu vermerken gab. Spitzenreiter ist hier Berlin mit einer Inzidenz von 18,6/100.000. Das Robert-Koch-Institut geht davon aus, dass dies durch die überdurchschnittliche Zahl an Risikopersonen wie zum Beispiel i.v. Drogenkonsumenten bedingt ist.

In der Altersverteilung zeigt sich, dass die Gruppe der 25–29-jährigen die höchste Inzidenzrate zu verbuchen hat, wobei Männer beziehungsweise Jungen eine über doppelt so hohe Neuerkrankungsrate zeigen wie Frauen beziehungsweise Mädchen. Über alle Altersgruppen verteilt zeigt sich dieser Trend mit einer Inzidenz bei Männern von 8,2/100.000 bzw. bei Frauen von 5,0/100.000.

Mit Hilfe eines Fragebogens konnten bei über 70% der Erstdiagnostizierten genauere Daten zu möglichen Risikofaktoren für Übertragungswege erhoben werden. Hierbei stellte sich heraus, dass 34,1% der Fälle mit i.v. Drogen in Kontakt kamen, in der Gruppe der 20–29-jährigen Männer sogar knapp 72%. Der sexuelle Übertragungsweg ist bei der Hepatitis C zwar vergleichsweise gering, jedoch könnte es einen Zusammenhang zwischen gesundheitlich riskanten sexuellen Praktiken, wie z.B. Analverkehr, und einer Ansteckung geben, was besonders im Zusammenhang mit HIV gezeigt wurde [4]. Das Übertragungsrisiko durch eine Bluttransfusion wird seit der zusätzlichen Untersuchung der Spender auf Hepatitis-C-Virus auf nur 1:4,2 Mio. geschätzt, was praktisch zu vernachlässigen ist.

## 1.2 Das Hepatitis-C-Virus

### 1.2.1 Genom

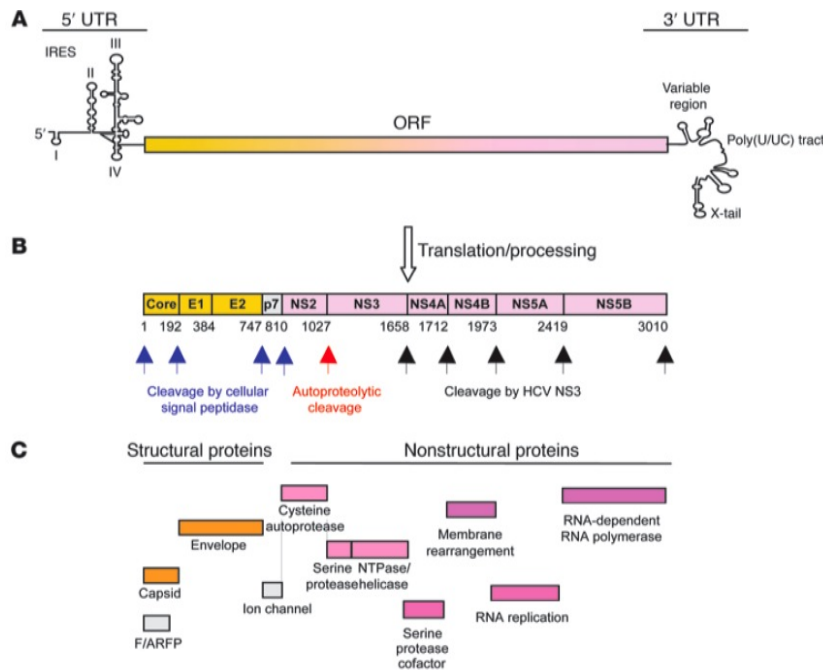
Das Hepatitis-C-Virus gehört zur Gattung der Hepaciviridae aus der Familie der Flaviviridae zu welcher auch das Dengue - und Gelbfiebervirus gehören. Das Merkmal dieser Virusfamilie ist ein umkapseltes einzelsträngiges positives RNA-Virusgenom. Das HCV Genom besteht aus einer ungefähr 9600 Basenpaaren langen einzelsträngigen RNA, die für ein einziges circa 3010 Aminosäuren langes Polyprotein kodiert [7].

Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie ließ sich zeigen, dass das HCV ein sphärischer Partikel mit einem Durchmesser von circa 55–65 nm ist. Die Oberflächenprojektionen haben eine Länge von ungefähr 6nm, bestehend aus den Strukturproteinen E1 und E2. Der innere Kern hat einen ungefähren Durchmesser von 30–35 nm [8].

Am 5'- und 3'-Ende des RNA-Virusgenoms befindet sich jeweils ein nicht kodierendes RNA-Segment mit einer Länge von 332 beziehungsweise 54 Basenpaaren [9] [6].

Diese RNA-Abschnitte beinhalten Kontrollelemente für die Translation des viralen Polyproteins und sind bei der Replikation von Bedeutung [7].

Zwischen diesen beiden nichtkodierenden Abschnitten liegt der für das HCV Polyprotein kodierende Abschnitt mit den Sequenzen für die Strukturproteine Core, E1, E2 und p7, auf die die Sequenzen der Nichtstrukturproteine NS1, NS2, NS3, NS4A, NS5A und NS5B folgen [7].



**Abbildung 1.2** Darstellung des RNA-Virusgenoms des Hepatitis-C-Virus sowie des durch Translation entstehenden Polyproteins und seiner Bestandteile, der Struktur- und Nichtstrukturproteine.

Quelle: [10]

Nach der Translation werden die Strukturproteine mit Hilfe einer Signalpeptidase am Endoplasmatischen Retikulum der Wirtszelle vom Polyprotein abgespalten. Die Nichtstrukturproteine werden daraufhin von den viralen Proteasen NS2-3 und NS3-4A aus dem Polyprotein abgespalten. Die Spaltung der einzelnen Proteine findet sowohl co- als auch posttranslational statt.

## 1.2.2 Struktur- und Nichtstrukturproteine

Das HCV Core-Protein mit einer Länge von circa 190 Aminosäuren bildet das Nukleokapsid [6]. Es ist auf der viralen RNA codiert und Teil des Polyproteins, von welchem es mit Hilfe von zellulären Proteasen im Endoplasmatischen Retikulum des Hepatozyten abgespalten wird [7]. Das Core-Protein scheint ein multifunktionelles Protein zu sein, welches durch Eindringen in zelluläre Mitochondrien an apoptotischen Signalen beteiligt ist. Die Interaktion des Core-Proteins mit Prohibitin, einem Chaperon für mitochondriale Proteine, resultiert in erhöhtem oxidativen Stress. Neben seiner strukturellen und regulatorischen Funktionen spielt das Core-Protein auch eine Rolle bei der Leberverfettung. Durch seinen Einfluss auf die Biosynthese von Fettsäuren in Hepatozyten scheint es eine Verbindung zu virusbedingter Leberverfettung zu haben [11].

Die Hüllproteine E1 und E2 sind strukturelle Teile des Virions und bilden das äußere Gerüst des Viruspartikels. Das Core-Protein ist mit Hilfe einer Transmembranhelix mit ihnen verbunden. E1 und E2 werden während der Translation am Endoplasmatischen Retikulum posttranslational modifiziert. Beide Glykoproteine haben einen entscheidenden Einfluss auf die Einschleusung des Virus in die Wirtszelle durch Interaktion mit Zellrezeptoren. E2 hat die Bindungsstelle für humanes CD81, welches unter anderem auf Hepatozyten und B-Lymphozyten exprimiert wird [12].

Das Nichtstrukturprotein NS2 ist eine membrangebundene Cysteinprotease von 32kDA. NS3 dagegen ist eine Serinprotease mit einer Größe von 67kDA. Zusammen sind sie verantwortlich für das Prozessieren aller Nichtstrukturproteine des vorher translatierten Polyproteins. NS4A dient hier als Cofaktor für die proteolytische Aktivität von NS3. Es konnte gezeigt werden, dass der Proteasekomplex NS3/NS4A den Interferon Signalweg unterbindet, welcher für das angeborene Immunsystem eine entscheidende Rolle bei der Bekämpfung der Virusinfektion spielt [13] [14] [15] [16].

Das Nichtstrukturprotein NS5B fungiert als RNA-abhängige RNA-Polymerase. Mit Hilfe der positiven HCV RNA als Matrize transkribiert es eine komplementäre Negativmatrize, mit welcher es wiederum positive HCV RNA synthetisiert [17, 18].

Das HCV Genom wird nicht in den Zellkern der Wirtszelle eingeschleust. Replikation mittels NS5B findet demnach im Zytoplasma des Hepatozyten statt, dort wird anschließend das Polyprotein am Endoplasmatischen Retikulum prozessiert [17].

### 1.2.3 Genotypen

Die RNA-Polymerase NS5B besitzt keine Korrekturlesefunktion. Im Laufe der Zeit haben sich dadurch evolutionär verschiedene Subspezies des Virus entwickelt. Diese große genetische Diversität des Hepatitis-C-Virus ist teilweise dafür verantwortlich, dass sich das Virus dem Immunsystem des Wirts entziehen kann und die Erkrankung somit eine sehr hohe Chronifizierungsrate aufzeigt [19] [6].

Die gültige Einteilung unterscheidet heutzutage 7 Genotypen, benannt nach den arabischen Ziffern, die per Definition in 72% der Aminosäuresequenz übereinstimmen müssen [6]. Diese Genotypen werden wiederum in Subtypen, benannt nach Buchstaben, unterteilt. Die verschiedenen Genotypen unterscheiden sich sowohl in ihrer geographischen Verteilung als auch in ihrem unterschiedlichen Ansprechen auf Therapie. Patienten mit dem Genotyp 1 zeigen ein deutlich schlechteres Ansprechen auf eine Therapie, daher ist bei ihnen eine längere Therapie erforderlich. Patienten der Genotypen 2 oder 3 sprechen dahingegen besser

auf eine Kombination von Ribavirin und Interferon an [19, 20]. Für Patienten mit dem Genotypen 1 sind seit 2011 die beiden Proteaseinhibitoren Boceprevir und Telaprevir in Verbindung mit der Kombination Ribavirin und Interferon zugelassen [21].

In Europa sowie Nord- und Südamerika finden sich hauptsächlich die Genotypen 1a und 1b, die für 60% der globalen Infektionen verantwortlich sind. Die Genotypen 2 und 3 sind weltweit vertreten, wobei Typ 2 seltener vorkommt als Genotyp 1 und Typ 3 besonders in Südostasien vertreten ist. Genotyp 4 tritt im Mittleren Osten, Ägypten und Zentralafrika auf. Typ 5 lässt sich fast ausschließlich in Südafrika nachweisen, während sich der Genotyp 6 hauptsächlich in Hongkong und Vietnam finden lässt. Die Genotypen 6 Subtypen sind lediglich in Asien vertreten [22-24] [6].

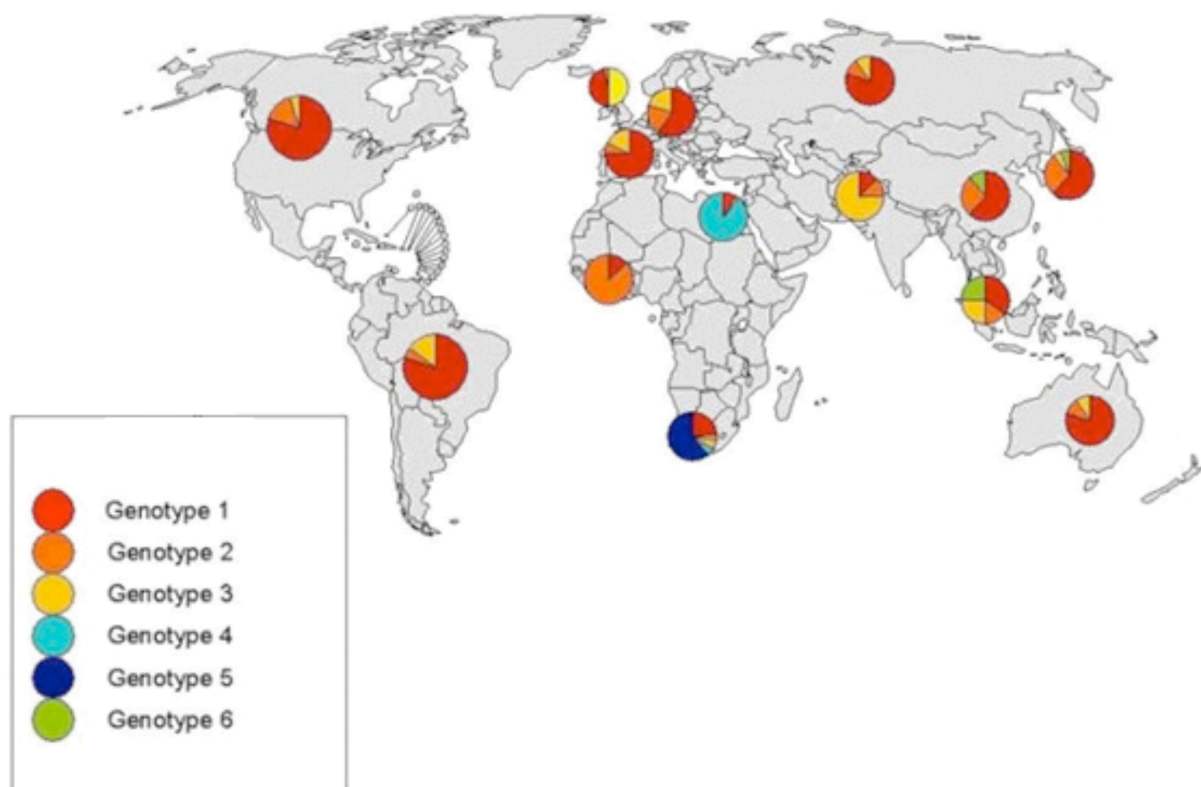


Abbildung 1.3 Weltweite Verteilung der HCV Genotypen. Quelle: [25]

#### 1.2.4 Lebenszyklus

Um sein Genom zu vervielfältigen, ist es für ein Virus erforderlich, dieses in die Wirtszelle einzuschleusen. Im Falle des behüllten Hepatitis-C-Virus beinhaltet dies das Andocken an die Wirtszelle und die anschließende Aufnahme in die Zelle in Form von Endozytose. Die Glykoproteine E1 und E2 sind entscheidend an diesem Vorgang beteiligt. Um ihre Funktion



auszufüllen, formen die beiden Strukturproteine ein nicht-kovalent gebundenes Heterodimer [26]. Zuerst muss der HCV Partikel an der Zielzelle andocken. Es wird angenommen, dass Glykosaminoglykane hier als Targetdomäne dienen [27]. Nach dem ersten Andocken muss das Virus an hochspezifische Rezeptoren binden, die ihm den Eintritt in die Wirtszelle ermöglichen. Im Falle des HCV sind bei Weitem noch nicht alle dieser Faktoren aufgedeckt. Einige wurden allerdings schon identifiziert, eine entscheidende Rolle in diesem Prozess zu spielen. CD81 ist ein Rezeptorprotein der Tetraspanin-Familie, welche je vier Transmembrandomänen sowie eine kleine und eine große extrazelluläre Schleife gemeinsam haben. CD81 interagiert mit dem Strukturprotein E2 auf der Virusoberfläche. Die Wichtigkeit dieses Rezeptors wird dadurch deutlich, dass in seiner Abwesenheit, bewiesen durch Knockout-Modelle, der HCV Zelleintritt deutlich reduziert wird [19, 27].

Ein weiterer Rezeptor, der vermutlich den Zelleintritt von HCV ermöglicht, ist der human scavenger receptor class B type 1 (SCARB1), welcher ursprünglich als Rezeptor für die Aufnahme von HDL-Partikeln entdeckt wurde [19, 27]. Zuletzt wurde das tight-junction-Protein Claudin-1 als Zelleintrittsfaktor entdeckt [28].

An den Prozess des Andockens folgt die Fusion der Virusoberfläche mit der Zellmembran. Im Fall des Hepatitis-C-Virus erfolgt eine Clathrin-gesteuerte Endozytose und anschließende Fusion in frühen Endosomen, aus welchen die virale RNA ins Zytosol entlassen wird [29] [30].

Diese RNA dient als messenger-RNA für die Synthese des Polyproteins. Die Einleitung der Translation des gewünschten Polyproteins wird durch eine ribosomale Andockstelle am hochkonservierten 5'-Ende herbeigeführt, welche die Rekrutierung von zellulären Proteinen, wie den Initiationsfaktoren 2 und 3, als auch von viralen Proteinen bewirkt [19].

Die Translation produziert ein Polyprotein, welches in oben beschriebene virale Proteine gespalten wird. Die Kapsidproteine bilden mit der viralen RNA das Nukleokapsid, welches in zytoplasmatischen Vesikeln auf dem sekretorischen Weg die Zelle verlässt [31].

### 1.3 Übertragungswege

Hepatitis C wird hauptsächlich parenteral durch den Kontakt mit infizierten Blutprodukten übertragen. Allerdings gibt es eine große Zahl an Fällen, bei denen der genaue Übertragungsweg nicht identifiziert werden konnte [32]. Auch in Deutschland bleiben laut Robert-Koch-Institut 25% der Übertragungswege ungeklärt [4].

Über lange Zeit waren Blutprodukte die bedeutendste Quelle der HCV Übertragung. Vor 1986 lag das Risiko einer Ansteckung mit HCV durch Bluttransfusion zwischen 5 und 13%,

welche bis 1990 nur auf 1,5 – 9% gesenkt werden konnte [32]. Nachfolgend entwickelte Möglichkeiten, Blutprodukte auf HCV-Antikörper zu untersuchen, konnten das Ansteckungsrisiko durch Blutprodukte allerdings drastisch senken und schließlich praktisch eliminieren.

Seit 1999 werden Spender zusätzlich zur Untersuchung auf HCV-Antikörper auch auf HCV RNA gescreent, sodass das verbleibende Restrisiko, sich bei einer Bluttransfusion mit HCV anzustecken, auf 1:4,2 Millionen geschätzt wird [33].

Ein weiterer iatrogener Risikofaktor für die HCV Übertragung war die Substitution von Gerinnungsfaktoren bei Hämophilie-Patienten. Durch die wiederholte Gabe von Blutprodukten erhöhte sich die Wahrscheinlichkeit der Ansteckung, sodass selbst heutzutage noch eine Inzidenz von 46 – 90% angenommen wird.

Gegenwärtig stellt allerdings der i.v. Drogenkonsum in Deutschland den häufigsten Ansteckungsmodus dar [4].

In einer Umfrage des Robert-Koch-Instituts gaben 71% der 20–29-jährigen HCV Patienten diese Exposition an. Das Vorkommen von HCV in der Gruppe der i.v. Drogenkonsumenten variiert erheblich von Studie zu Studie (zwischen 31% und 98%) und ist abhängig von der geographischen Region. In den USA liegt die Inzidenz von Hepatitis C in der Gruppe der i.v. Drogenabhängigen bei 60–90% [34]. Fachgesellschaften sehen hier eine Tendenz, die auch in Deutschland in Zukunft noch steigende Inzidenzraten in dieser Expositionsgruppe bringen könnte [35].

Abgesehen von „needle sharing“ als einen großen Risikofaktor unter Drogenabhängigen führt auch anderes risikoträchtiges Verhalten in dieser Gruppe zu einer solch hohen Inzidenz. Es wurde gezeigt, dass die Prävalenz von HCV proportional mit der Dauer der Drogenabhängigkeit in Verbindung steht [36].

Prostitution, gewisse sexuelle Praktiken und Promiskuität stellen weitere Ansteckungsquellen dar.

Das Risiko einer sexuellen Übertragung von Hepatitis C ist relativ gering, besonders verglichen mit dem Übertragungsrisiko anderer sexually transmitted diseases (STD) wie zum Beispiel Hepatitis B oder HIV. Dennoch ist dieser Übertragungsweg nicht zu vernachlässigen, da Sex ein häufiges Verhalten darstellt und somit statistisch zum Tragen kommt.

Die Frage der sexuellen Übertragung ist insofern noch nicht hinreichend geklärt, als dass die vorhandene Datenlage sehr kontrovers ist. Hierbei müssen zwei verschiedene Gruppen unterschieden werden. Zum einen monogame, heterosexuelle Partnerschaften und zum anderen Menschen mit riskanten sexuellen Verhalten, wie beispielsweise vielen

verschiedenen sexuellen Partnern, homosexuelle Beziehungen sowie Prostituierte. Eine zusätzliche HIV-Infektion oder eine andere STD erhöht die Infektionsrate für Hepatitis C ebenfalls und gehört damit in die Gruppe der sexuellen Risikofaktoren [37].

Die erstgenannte Gruppe hat ein sexuelles Übertragungsrisiko von circa 0 – 0,6% pro Jahr, aus diesem Grund wird Partnern in einer monogamen, heterosexuellen Beziehung nicht unbedingt das Verwenden von Kondomen empfohlen. Andere Studien berichten von einem sexuellen Übertragungsrisiko von 0 – 24% beziehungsweise von 0 – 28% in monogamen heterosexuellen Beziehungen [37] [38]. Die zweite Gruppe zeigt ein weit höheres Infektionsrisiko. In unterschiedlichen Studien liegt die Rate an Hepatitis-C-Positiven bei sexuell riskantem Verhalten zwischen 1,6 und 25,5%, wobei dies immer noch unter der Rate an Hepatitis-B- oder HIV-Infektionen liegt [37].

Als letztes gilt auch der häusliche Kontakt als eine Infektionsquelle. Dieser ist für die vorliegende Arbeit besonders entscheidend, da das untersuchte Patientenkollektiv mit chronischen HCV Patienten einen Haushalt teilt. Als Infektionsquellen im häuslichen Umgang ist besonders der Umgang mit Gegenständen zu nennen, die zu einer Verletzung und somit wiederum durch Blutübertragung zu einer Ansteckung führen könnten. Dazu zählt z.B. das gemeinsame Nutzen von Rasierapparaten, Nagelpflegesets oder auch Zahnbürsten [39] [40]. Da diese Ansteckungsquellen jedoch auch bei anderen Haushaltmitgliedern zum Tragen kommen können und hier nur einen geringen Anteil ausmachen, bleibt die Frage inwieweit die sexuelle Übertragung des Hepatitis-C-Virus in Partnerschaften eine Rolle spielt. In epidemiologischen Studien kristallisierte sich heraus, dass bei Personen, die im sexuellen Kontakt zueinander stehen, die intrafamiliären Übertragungsraten höher sind als bei anderen Haushaltsmitgliedern [41]. In unterschiedlichen Studien lag die Prävalenz von HCV bei Personen, die einen gemeinsamen Haushalt mit einem HCV Patienten teilen bei 0 – 11% [32]. Hierbei zeigt sich, dass Ehepartner mit sexuellem Kontakt mehr betroffen sind als Kinder oder andere Personen im Haushalt [39] [41].

Bei sexuellem Kontakt ist das Übertragungsrisiko höher, wenn der Mann infiziert ist. In einigen Studien wurde auch die Länge einer Partnerschaft beziehungsweise einer Ehe als Risikofaktor identifiziert: besteht die Partnerschaft über 15 Jahre steigt das Infektionsrisiko [39] [42]. In anderen Studien konnte jedoch kein kausaler Zusammenhang zwischen Zeit und Virusübertragung nachgewiesen werden [37] [38] [43].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Übertragung in besonderem Maße auf dem parenteralen Weg stattfindet, wobei nach der Entwicklung suffizienter Blutscreeningtests die Gabe von Blutprodukten nicht mehr an erster Stelle der Risikofaktoren gilt. Bei der sexuellen

Übertragung ist das Risiko in monogamen, heterosexuellen Partnerschaften relativ gering, besonders im Vergleich zur Hepatitis B, jedoch nicht vernachlässigbar.

## 1.4 Immunologie der Hepatitis-C-Virus-Infektion

Seit der Entdeckung des Hepatitis-C-Virus vor über 20 Jahren wurden viele Fortschritte in der Entschlüsselung des viralen Lebenszyklus und seiner Interaktion mit dem humanen Immunsystem gemacht. Nichtsdestotrotz stehen wir noch vor dem Problem, dass sich bei 60 – 80% der infizierten Personen eine chronische Infektion entwickelt und dass die Hälfte der Patienten nicht angemessen auf die aktuelle Therapie mit Ribavirin und pegyliertem IFN reagiert [17] [31]. Auch die neuen Therapiemöglichkeiten für Patienten mit Genotyp 1, eine Tripletherapie aus Ribavirin PEG-Interferon sowie Boceprevir oder Telaprevir, können nicht verhindern, dass weiterhin ein Drittel bis ein Viertel der Genotyp 1 Patienten unter Therapie nicht ausheilen [21]

Das Virus zeigt einige Strategien das angeborene und das erworbene Immunsystem zu umgehen, die im Einzelnen noch nicht verstanden sind.

Die Hepatitis-C-Virus-Infektion lässt sich in 3 Phasen einteilen: die Inkubationsphase, die akute Infektion und abhängig vom Ausgang der Infektion entweder die Ausheilung oder die Chronifizierung [31].

In der Inkubationsphase, die circa 2 bis 3 Monate andauern kann, erreichen die HCV Titer ihre Spitze bereits in der ersten Woche nach Infektion [31, 44] [45]. In einem Schimpansen-Modell konnte gezeigt werden, dass sich die virale Replikation und damit die HCV RNA Titer in der Gruppe der später ausgeheilten im Vergleich zu der Gruppe der Chronifizierenden zu diesem Zeitpunkt der Infektion noch nicht unterscheiden. Beide zeigen einen Anstieg der Titer in den ersten beiden Wochen, mit einem deutlichen Abfall in den Wochen 8 bis 12 [44].

Die akute Infektionsphase zeichnet sich durch einen Anstieg der ALT aus, welche gleichzeitig mit dem Anstieg der HCV spezifischen T-Zellantwort in der Leber auftritt [17]. In dieser Phase zeigen allerdings auch nur 20 – 30% der Patienten klinische Symptome wie z.B. Ikterus [31]. Patienten die symptomatisch und ikterisch werden, haben eine höhere Wahrscheinlichkeit auf Ausheilung, als solche, die keine Zeichen der Infektion zeigen [46].

HCV spezifische Antikörper sind zu diesem Zeitpunkt mittels Enzym Immunoassays messbar [17]. RNA-Titer nehmen nun unabhängig vom Ausgang der Infektion um 2–3-Logarithmus-Stufen ab [17]. Die letzte Phase der Infektion zeigt entweder eine Ausheilung oder geht in

eine Chronifizierung der Erkrankung über. Bei einer Ausheilung verschwindet die HCV-RNA. Die Antikörper nehmen häufig auch ab und bei einigen Patienten können sie nach Jahren ganz verschwinden. Eine HCV spezifische T-Zellantwort ist in der Regel auch in diesen Patienten noch nachweisbar. Im Falle einer Chronifizierung bleiben HCV RNA Titer relativ stabil im Bereich von 1 bis 2 log-Stufen unterhalb der Akutinfektion; HCV spezifische Antikörper steigen jedoch im Laufe der Zeit an, während spezifische T-Zellen abnehmen und in *in vitro* Versuchen kaum nachweisbar sind [31].

An der Bekämpfung des Virus nehmen viele verschiedene Teile des menschlichen Immunsystems teil.

In der Anfangsphase der Infektion steht das angeborene Immunsystem im Vordergrund.

Hepatozyten erkennen mit Hilfe von Toll-like-Rezeptoren 3 (TLR 3) virale dsRNA. Dies führt zu einer Signalkaskade, welche in der Produktion von Interferon- $\beta$  und nachfolgend der Transkription Interferon- $\beta$ -abhängiger Gene endet [31]. Interessanterweise korreliert diese Typ-I-IFN-Antwort nicht mit dem Ausgang der Infektion [17].

Es wird angenommen, dass das Hepatitis-C-Virus auf verschiedene Arten dem Immunsystem des Wirts entkommt. In Falle der Interferon- $\beta$ -Antwort sind einige dieser Strategien identifiziert worden. Die Nichtstrukturproteine NS3/4A spalten einige Enzyme der Interferon-Signalkaskade und behindern somit die Transkription von IFN- $\beta$  und IFN- $\beta$ -abhängiger Gene [31].

Eine weitere wichtige Zellpopulation des angeborenen Immunsystems sind die dendritischen Zellen. Diese Antigenpräsentierende Zellen spielen eine wichtige Rolle dabei, viele Antigene zu prozessieren und spezifische Immunreaktionen zu initiieren [47]. Eine Behinderung in der Interaktion von Antigenpräsentierenden Zellen und T-Zellen kann dazu beitragen, dass das Immunsystem des Wirts das Virus nicht eliminieren kann [47].

Doch auch diese Zellpopulation zeigt bei einer HCV Infektion keine suffiziente IFN-I-Antwort. Durch diese fehlende Funktion könnte die ungenügende und verspätete HCV spezifische T-Zellantwort bei Chronifizierung begründet sein [31].

Natürliche Killerzellen sind häufig in der Leber anzufinden und zeichnen sich durch ihre Zytotoxizität aus. In *in vitro* Versuchen wurde gezeigt, dass NK-Zellen von HCV Patienten inhibitorische Rezeptoren exprimieren und mit Hilfe ihres Zytokinmusters die angeborene Immunantwort dämpfen [48].

HCV spezifische T-Zellen sind unverzichtbar für eine suffiziente HCV Elimination. Doch in Schimpansen-Modellen hat sich gezeigt, dass das HCV in der frühen Phase der T-Zellantwort dem Immunsystem zeitlich einen Schritt voraus ist [47].

Hierbei hat sich im Besonderen gezeigt, dass CD4<sup>+</sup> Zellen ein wesentlicher Bestandteil einer HCV spezifischen Immunantwort sind [31]. Experimentelle Depletion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen führt zu einer schlechten CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort und somit zu verlängerter Virämie [47].

Die beiden CD4<sup>+</sup> Helferzellsubtypen TH1 und TH2 haben im Immunsystem unterschiedliche Aufgaben. Während die TH1-Zellen für eine zellvermittelte Immunantwort mit dem Zytokinmuster IL-2, IL-12 und IFN stehen, zeichnen sich TH2-Zellen durch eine starke humorale Antwort mit den Zytokinen IL-4, IL-6 und IL-10 aus [47].

Da die HCV Eliminierung sehr von einer starken zellulären Antwort abhängt, hat die Differenzierung in die jeweils eine oder andere Richtung eine Auswirkung auf den Ausgang der Infektion. Es scheint der Fall zu sein, dass das Core Protein einen Einfluss auf das für die TH1-Entwicklung notwendige Zytokinprofil hat und damit eine Entwicklung in diese Richtung schwächt [47].

Patienten, die spontan ausheilen zeigen somit eine Multiepitopen-spezifische CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Antwort, während Patienten, die chronifizieren, eine verspätete und weniger starke T-Zellantwort zeigen [17].

Die Abnahme der viralen RNA überschneidet sich mit dem Auftreten von HCV spezifischen T-Zellen und der IFN $\gamma$  Expression in der Leber [31]. Ob der IFN- $\gamma$ -Anstieg Grund für die Viruselimination, oder nur Ausdruck der spezifischen T-Zellantwort ist, ist noch ungewiss.

Die HCV spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort ist essentiell für eine suffiziente Immunantwort. Schon bei Beginn des klinisch messbaren ALT-Anstiegs lässt sich, bei Patienten die das Virus später ausheilen werden, eine Proliferation von CD4<sup>+</sup> Zellen nachweisen. Im Gegensatz dazu ist die HCV spezifische CD4<sup>+</sup> Immunantwort im Falle einer späteren Chronifizierung schwach oder nicht nachweisbar [49].

Weiterhin scheint es von Wichtigkeit zu sein, die CD4<sup>+</sup> Antwort lange aufrechtzuerhalten. Bei Verlust einer vorher bestehenden starken CD4<sup>+</sup> Antwort sieht man ein Wiederauftreten der Virämie auch nach vorheriger monatelanger Kontrolle des Virus [50].

Während die CD4<sup>+</sup> Zellpopulation für die Koordination der Immunantwort zuständig sind, sind die CD8<sup>+</sup> Zellen das ausführende Organ mit antigenspezifischer Zytotoxizität. HCV scheint die Funktionalität der CD8<sup>+</sup> Zellen zu schwächen indem es die Zellreifung stört und die Funktion der Zellen verändert [47]. Die Untersuchung von HCV spezifischen CD8<sup>+</sup> Zellen aus Blut und Lebergewebe hat einige dieser Funktionsdefekte aufgedeckt. Dazu gehört

eine veränderte Zellreifung, die zu einem Zellphänotyp führt, welcher schlechter proliferiert, eine dürftige peptidspezifische Zelltoxizität zeigt und wichtige Effektorzytokine wie IFN- $\gamma$ , TNF oder Porforine in geringeren Mengen ausschüttet [47]. Insgesamt führen diese Veränderungen zu einer reduzierten Fähigkeit der CD8<sup>+</sup> Zellen ihre Funktion auszuführen, welche essentiell für eine suffiziente Viruselimination wäre.

Die Rolle der humoralen Antwort in der HCV Infektion ist bis jetzt nicht geklärt. Im Vergleich zu anderen Infektionen, bei denen die humorale Antwort des Immunsystems eine entscheidende Rolle spielt, scheint es dem HCV auch hier zu gelingen, diesen Arm der Immunantwort zu umgehen [47]. Das Strukturprotein E2 weist eine hohe Mutationsrate auf, die dazu führt, dass HCV Partikel entstehen, die der Erkennung und Bindung von neutralisierenden Antikörpern entkommen können [47].

Logvinoff et al. bewiesen in ihrer Arbeit, dass HCV neutralisierende Antikörper bei der Mehrheit der gemessenen chronisch infizierten HCV Patienten vorkamen, während bei HCV Ausheilung bedeutend seltener neutralisierende Antikörper zu finden waren [51].

Ist das Immunsystem unfähig, das Virus zu eliminieren, endet die Infektion in einer chronischen Krankheit. Man schätzt, dass 60–80% der Hepatitis-C-Infektionen diesen Ausgang nehmen [17].

Chronische HCV ist assoziiert mit einer kontinuierlichen, allerdings geschwächten und in ihrer Bandbreite reduzierten HCV spezifischen T-Zellantwort. Auffallende Veränderungen in der Serum-ALT-Höhe oder der HCV Titer sind höchst selten und deuten daher auf eine Coevolution des Virus und des Wirts hin [31].

HCV spezifische CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind in all ihren Effektorfunktionen geschwächt, und haben als einzige Anzeige auf eine Immunantwort eine leichte IFN $\gamma$ -Produktion [31].

Ein Grund hierfür könnten die erhöhten IL-10-Titer sein, die bei chronischen HCV Patienten messbar sind. In einem *in vitro* Modell wurde gezeigt, dass IL-10 produzierende CD8<sup>+</sup> T-Zellen die IFN $\gamma$ -Produktion sowie die Proliferation von HCV spezifischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen hemmen [31, 52].

Das Hepatitis-C-Virus scheint mit seiner hohen Mutationsrate und der Fähigkeit, das menschliche Immunsystem zu alterieren beziehungsweise zu umgehen, einen großen Anteil an der hohen Chronifizierungsrate beizutragen [31] [47].

## 1.5 Diagnostik der HCV Infektion

Da die HCV Infektion klinisch nicht unterscheidbar ist von anderen akuten Infektionen und oft lediglich unspezifische Anzeichen wie Müdigkeit und Fieber zeigt, wird selten sofort eine spezifische HCV Diagnostik durchgeführt.

Der klassische Screeningtest um eine akute HCV Infektion auszuschließen, ist der Antikörpertest zur Untersuchung auf spezifische HCV-Antikörper. Da Antikörper erst 2 bis 8 Wochen nach einer Leberinfektion produziert werden, kann der Test initial negativ ausfallen. Dies macht den Antikörpertest alleine zu einem relativ unsicheren Diagnosemittel [53]. Manche Patienten bleiben noch Monate nach Infektionsbeginn Antikörper-negativ [6]. Daher sollte bei Verdacht auf eine akute Hepatitis C Infektion zusätzlich die HCV RNA mittels PCR bestimmt werden, welche schon Tage nach der Infektion eine Virämie beweist.

Eine akute Infektion ist wahrscheinlich bei Auftreten von HCV RNA im Serum bei gleichzeitig negativem Antikörpertest [19], welche durch eine nachfolgende Serokonversion bestätigt wird. Akut infizierte Personen können allerdings auch HCV RNA und Antikörper positiv sein. In diesem Fall ist eine Unterscheidung zwischen einer akuten Infektion und einer akuten Exazerbation einer chronischen Infektion sehr schwierig [19].

Fallen sowohl der Antikörpertest als auch die Untersuchung auf virale Partikel negativ aus, ist eine akute Infektion höchst unwahrscheinlich [19]. Die Gegenwart von HCV-Antikörpern bei negativer HCV RNA lässt auf eine spontane Viruselimination oder erfolgreiche Therapie schließen [19]. Eine möglichst frühe Diagnose im Verlauf der Infektion erhöht die Chance auf eine erfolgreiche Therapie [6].

## 1.6 Klinischer Verlauf und therapeutische Möglichkeiten der Hepatitis-C-Virus-Infektion

Die akute Phase der Hepatitis-C-Infektion ist meist asymptomatisch, man schätzt dass 80% der Patienten keine Symptome beklagen [54]. Eventuelle klinische Zeichen beinhalten unspezifische Symptome wie Fieber, Myalgien oder allgemeines Unwohlsein [19]. Diese Symptome treten zwischen der dritten und zwölften Woche nach Infektion auf [53].

Trotz teils sehr variierender Verläufe lassen sich drei grobe Muster für den weiteren Ausgang der Infektion feststellen. Entweder das Virus wird eliminiert und die Infektion heilt aus oder der Wirt gewinnt keine Kontrolle über das Virus, welches weiter persistiert. Die dritte Variante zeigt eine zeitweise Kontrolle über das Virus mit wiederkehrenden Rezidiven [19].



Insgesamt nimmt die Infektion bei circa 75–85% der Patienten einen chronischen Verlauf [19]. Chronisch wird hierbei definiert als eine persistierende Virämie über 6 Monate nach Infektion.

Die Chronifizierungsrate der Hepatitis C ist von mehreren Faktoren abhängig. Einer dieser Faktoren ist das Alter bei Erstinfektion. Auf Grund von unterschiedlichen Untersuchungen wird geschätzt, dass das Risiko für eine Chronifizierung bei Kindern zwischen 50 – 60% liegt; dies liegt unterhalb der Rate bei Erwachsenen [53].

Auch Frauen scheinen eine geringere Chronifizierungsrate zu zeigen [53]. In wie weit das Geschlecht Einfluss auf den Ausgang der Erkrankung nimmt, ist noch ungewiss, Östrogenen wird allerdings ein antifibrotischer Effekt zugeschrieben [19].

Eine weitere Entdeckung ist die Tatsache, dass Patienten mit Krankheitssymptomen und Gelbsucht bei Ausbruch der Erkrankung später eine niedrigere Chronifizierung zeigen als solche, die anfangs asymptomatisch bleiben. Dies hängt eventuell mit der starken anfänglichen Immunantwort zusammen, die durch Symptome wie Ikterus zum Ausdruck kommt [53].

Zusätzlich zu den bereits genannten Risikofaktoren wirken sich Alkoholkonsum von über 50g täglich, eine HIV-Koinfektion sowie Adipositas und Fettleber negativ auf den Ausgang der Erkrankung aus [19].

Der HCV Genotyp dahingegen scheint kaum Einfluss auf das klinische Bild der Erkrankung oder ihren langfristigen Ausgang zu haben [53].

Langfristig sind die größten Gefahren der Krankheit die Entwicklung einer Leberzirrhose oder eines Hepatozellulären Carcinoms [53]. Personen mit chronischer HCV Infektion haben ein Risiko von ungefähr 10 – 20% innerhalb von 20 Jahren an Leberzirrhose zu erkranken. Hepatozelluläre Carcinome entstehen bei 1 – 5% der Patienten mit Leberzirrhose pro Jahr [6]. Global gesehen ist die HCV Infektion für 27% der Leberzirrhosen sowie für 25% der hepatozellulären Carcinome verantwortlich [55].

Die aktuelle Standardtherapie der chronische Hepatitis-C-Virus-Infektion besteht aus Interferon- $\alpha$  kombiniert mit dem Nukleosidanalogon Ribavirin, sowie seit 2011 aus der Hinzugabe der Proteaseinhibitoren Boceprevir oder Telaprevir für Patienten mit dem Genotypen 1 [19] [21].

Für viele Jahre bestand die Therapie aus einer Monotherapie mit Interferon- $\alpha$ . Diese in den 1990er-Jahren vorherrschende Therapieform hatte viele Nachteile. Einer der gravierendsten Nachteile war die Tatsache, dass nur bei 40% der behandelten Patienten die Viruslast in

unmessbare Bereiche sank und bei 50 – 90% der Patienten bei Absetzen der Medikamente ein Rezidiv auftrat [56]. Die sogenannte sustained virological response lag bei einer Behandlungsdauer von 6 Monaten bei nur 8% und konnte durch eine Verlängerung der Therapie auf 12–24 Monate auf bis zu 27% gesteigert werden [19]. Die SVR ist der Marker für die Effektivität der Behandlung bei Hepatitis-C-Virus-Infektion. Eine SVR bedeutet, dass 6 Monate nach Absetzen der Therapie keine Viruslast nachweisbar ist.

Der genaue Wirkmechanismus von Interferon- $\alpha$  ist bis heute nicht verstanden. Es wirkt scheinbar sowohl auf viraler Ebene, indem es die Virus Replikation hemmt, als auch auf immunmodulatorischer Ebene, indem es das Immunsystem des Wirts anregt [19, 57].

Bei der Behandlung mit Interferon- $\alpha$  treten erhebliche Nebenwirkungen auf. 82% der Patienten zeigen ein Influenza-ähnliches Nebenwirkungsprofil mit Fieber, Schüttelfrost, Gliederschmerzen und allgemeinem Unwohlsein [56]. Neuropsychiatrische Probleme wie Depression oder Angst treten bei ungefähr 20% der Patienten auf. Bei 5% der Patienten kommt es zu einer Knochenmarksdepression mit Granulozytopenie, Thrombozytopenie und Anämie [56].

Die Einführung von Ribavirin in Kombination mit Interferon- $\alpha$  als Therapieoption erhöhte die SVR auf circa 38% bei einer Therapielänge von 48 Wochen [19, 58].

Allerdings kann bei bis zu 20% der Patienten die Therapie als Kombination auf Grund von Nebenwirkungen nicht durchgeführt werden [56].

Die Halbwertszeit von Standard-Interferon- $\alpha$ -2a liegt bei 3,7–8,5 Stunden die von Standard-Interferon- $\alpha$ -2b bei 2 bis 3 Stunden. Dadurch entstehen starke Konzentrationsschwankungen im Blut die es dem Virus erlauben in Phasen niedriger Konzentration zu replizieren was eine Erklärung für die hohe Rate an Therapiemisserfolgen sein könnte [56, 59].

Durch das Anhängen eines Polyethylenglykols (PEG) konnte das Medikament so modifiziert werden, dass die Halbwertszeit nun deutlich höher liegt und die Serumkonzentration keiner starken Schwankung mehr unterliegt [56].

Es konnte gezeigt werden, dass durch die Einführung von pegyliertem Interferon eine erhöhte SVR erzielt wird [19]. In der Kombination mit Ribavirin werden SVR-Raten von 35 – 66% beobachtet [60].

Das Ansprechen auf die Therapie ist stark vom Genotypen des Virus abhängig. Patienten, die mit den Genotypen 2 und 3 infiziert sind, reagieren besser auf die Therapie als Patienten mit dem in Westeuropa und USA meist vertretenen Genotyp 1 [19, 53]. Diese erhöhte Ansprechbarkeit hat auch klinische Relevanz. Patienten mit den therapieempfindlichen

Genotypen 2 und 3 werden mit einer reduzierten Dosis an Ribavirin therapiert. Peginterferon wird in diesem Fall nur 24 anstatt 48 Wochen gegeben [19, 53].

Am 13.05.2011 beziehungsweise 23.05.2011 hat die Amerikanische U.S. Food and Drug Administration, FDA, die Marktzulassung für die Verwendung der Proteaseinhibitoren Boceprevir und Telaprevir erteilt [61]. Die European Medicines Agency, EMA, zog im Juli 2011 mit der Zulassung beider Proteaseinhibitoren nach. Beide Medikamente sind in Verbindung mit Ribavirin und pegyliertem Interferon- $\alpha$  zur Ersttherapie sowie erneuten Therapie bei bisheriger Therapieresistenz der Genotyp 1 Hepatitis-C-Infektion zugelassen. Von dieser neuen Therapiekombination erhofft man sich eine erhöhte sustained virologic response, die sich in Phase 3 Studien mit über 1500 Patienten bereits abzeichnete. Sie lag in einer von Sherman et al. 2011 im New England Journal of Medicine publizierten Studie bei über 70% der Patienten [62]. Auch andere groß angelegte Phase III Studien konnten zeigen, dass die zusätzliche Therapie mit Boceprevir oder Telaprevir eine höhere Ansprechrate zeigt verglichen mit der bisherigen Standardtherapie aus Ribavirin und PEG-Interferon. Dies konnte sowohl bei der Erstbehandlung mit einer Steigerung der Ansprechrate von circa 38 – 44 % auf 63 – 75 %, als auch bei der Behandlung bisher erfolglos therapierter chronischer HCV Patienten mit einer Steigerung von durchschnittlich 17 – 21 % auf 59 – 66 % verdeutlicht werden [21] [63]. Für beide Medikamente gibt es genaue Therapiealgorithmen, welche die Länge der Behandlung und die Kombination der Medikamente festlegt, abhängig von einer vorhandenen Vorbehandlung der Patienten, sowie der jeweils gemessenen HCV-RNA Last unter Therapie [63]. Mögliche Nebenwirkungen zeigen sich bei der Behandlung mit Telaprevir insbesondere in Form eines ekzematösen Hautausschlages, einer verstärkten Anämie, sowie Diarrhoen und Übelkeit, beziehungsweise bei der Behandlung mit Boceprevir ebenfalls in Form von Anämie und Geschmacksstörungen.

## 1.7 Zielsetzung

Trotz intensiver Forschung ist es bis heute noch nicht gelungen, einen Impfstoff zu entwickeln, der eine Infektion mit dem Hepatitis-C-Virus verhindert oder zumindest den Ausgang in eine chronische Erkrankung abwenden könnte.

Eine Infektion mit dem Hepatitis-C-Virus muss nicht bei allen Infizierten zwingend chronisch enden. Ein Teil der infizierten Patienten ist in der Lage das Virus zu eliminieren und somit die Infektion spontan auszuheilen. Das Immunsystem dieser Personen zeichnet sich durch eine starke, frühe und effektive T-Zellantwort aus. Dahingegen zeigen Personen, die eine chronische Infektion entwickeln keine effiziente Immunantwort, die in der Lage wäre, eine dauerhafte Viruselimination zu erreichen.

Zusätzlich hat sich gezeigt, dass es Menschen gibt, die trotz wiederholten Kontakts zum Hepatitis-C-Virus beziehungsweise zu HCV erkrankten Personen gesund bleiben.

In verschiedenen Studien wurden Familienmitglieder und Partner von Hepatitis-C-Patienten auf ihre HCV spezifische Immunantwort untersucht.

Bei Personen, die HCV-Antikörper und HCV RNA negativ getestet wurden konnte eine CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort auf sowohl Struktur- als auch Nichtstrukturproteine des Hepatitis-C-Virus gezeigt werden [64]. Eine weitere Untersuchung ergab, dass Partner von HCV Patienten eine CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort zeigen, die die Immunantwort von chronisch Kranken übersteigt und in Einzelfällen vergleichbar ist mit der Effektivität der Immunantwort von Patienten, die eine Infektion spontan ausheilen konnten [65].

Die nachfolgende Arbeit hat sich daher zum Ziel gesetzt dieses Kollektiv von HCV exponierten Personen genauer zu untersuchen. Diese fünf Fragestellungen standen dabei im Mittelpunkt:

1. Treten HCV spezifische Lymphozyten im Blut von exponierten Lebenspartnern von Hepatitis-C-Patienten auf?
2. Zeigt die Immunreaktion in dieser Gruppe von exponierten Personen ein spezifisches Antwortprofil? Inwieweit unterscheidet sich dieses von der Immunantwort chronischer HCV Patienten beziehungsweise von ausgeheilten Personen, die in der Lage waren, das Virus spontan zu eliminieren?

3. Zeigen Lymphozyten von exponierten Personen die Eigenschaft, unter kontrollierten Bedingungen in einer Zellkultur zu proliferieren, wenn sie in Kontakt mit HCV Proteinen kommen? Unterscheidet sich das eventuell gezeigte Proliferationsmuster von dem, HCV ausgeheilten Probanden und chronischer HCV Patienten?
4. Zeigt sich in der Zellkultur mit Lymphozyten von exponierten Personen bei Stimulation mit HCV Proteinen eine Sekretion des Zytokins IFN $\gamma$ ? Lassen sich mittels HLA-Klasse-II-Tetrameren HCV spezifische CD4<sup>+</sup> Lymphozyten nach Zellkultur identifizieren?
5. Lässt sich mit diesen Ergebnissen klären, ob es eine Art Immunisierung gegen das Hepatitis-C-Virus gibt, welche Risikogruppen trotz jahrzehntelanger Exposition davor schützt sich zu infizieren?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Probandengruppen

Das für die Untersuchung benötigte Personenkollektiv bestand aus 4 verschiedenen Personengruppen. Im Mittelpunkt stand die Gruppe der HCV exponierten Personen. Diese Gruppe muss als gesund angesehen werden, sie stellt allerdings durch ihre intensive Exposition mit einer chronisch erkrankten Person eine sehr spezielle und interessante Gruppe dar, welche genauer zu untersuchen Ziel dieser Arbeit war.

Die Gruppe der in die Studie eingeschlossenen chronisch erkrankten HCV Patienten enthält die Ehepartner der exponierten Personen, die Kontrollgruppe der Normalpersonen bestand aus gesunden Personen, die keinen bekannten Kontakt zu dem Hepatitis-C-Virus hatten. Die letzte Untersuchungsgruppe bestand aus Personen, die nach akuter HCV Infektion spontan ausgeheilt sind. Im Folgenden werden die einzelnen Gruppen genauer charakterisiert.

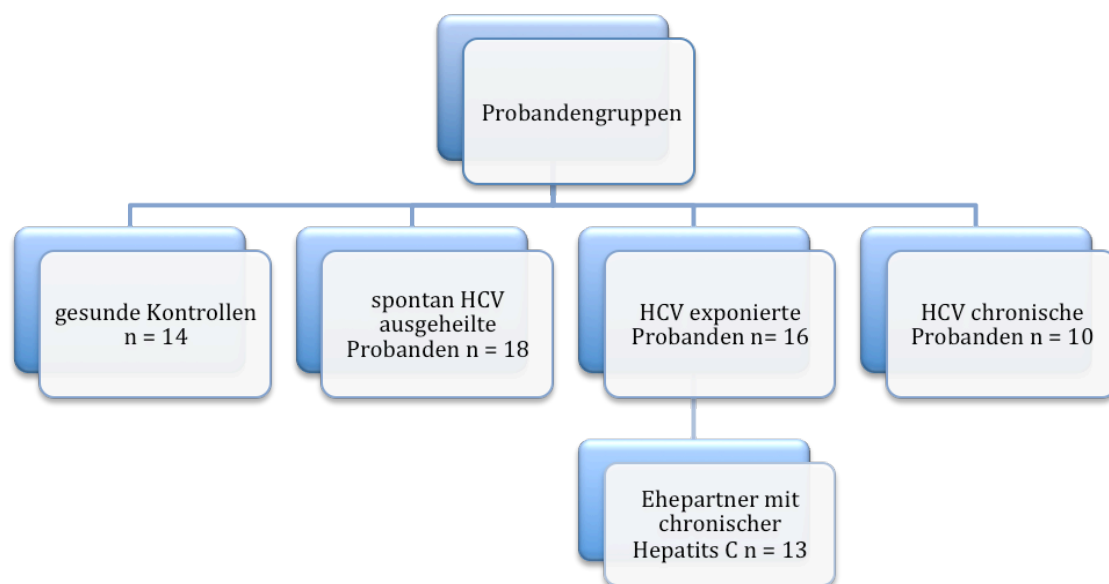


Abbildung 2.1 Graphische Darstellung der verschiedenen Probandengruppen

##### 2.1.1.1 Normalpersonen

Die Gruppe der Normalpersonen bestand aus 14 Personen. Hierbei handelte es sich um 9 Mitarbeiter des Instituts für Immunologie, 2 Mitarbeiter des Klinikums Großhadern beziehungsweise einen Mitarbeiter der Ludwig-Maximilians-Universität sowie 2 Medizinstudenten der LMU.

Das Geschlechterverhältnis lag bei 9:5, wobei 9 Frauen und 5 Männer an der Studie teilnahmen. Bei Abnahme der benötigten Menge Blut von 30ml befanden sich die Personen anamnestisch in gutem Gesundheitszustand. Das mediane Alter bei Blutabnahme lag insgesamt bei 29 Jahren. Ausschlusskriterien waren eine durchgemachte Hepatitis B oder C, chronische Erkrankungen sowie akute Infektionen zum Zeitpunkt der Blutabnahme.

#### **2.1.1.2 Probanden mit spontan ausgeheilter akuter Hepatitis C**

Die Gruppe der Probanden, die eine durchgemachte HCV Infektion spontan ausheilen konnten bestand aus 18 Personen. Alle Personen sind Patienten der Medizinischen Klinik II des Klinikums Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität. Sie waren bereit zu Studienzwecken venöses Blut zu spenden.

Unter den 18 Probanden befanden sich 10 Frauen und 8 Männer.

Das mediane Alter bei Infektion mit dem Hepatitis-C-Virus lag bei 38,8 Jahren. Die verwendeten Zellen wurden im Durchschnitt zu einem Zeitpunkt von 4,7 Jahren nach Infektionsbeginn abgenommen. Das mediane Alter bei Blutspende lag bei 48,5 Jahren. Der Infektionsmodus war in den verschiedenen Fällen sehr unterschiedlich und ist in der nachfolgenden Tabelle beschrieben.

<b>Proband</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter bei Blutspende</b>	<b>Jahre nach Infektion bei Blutspende</b>	<b>Infektionsmodus</b>
Proband A	Weiblich	41	5	Sexuell, i.v. Drogen
Proband B	Weiblich	64	3	Sexuell
Proband C	Männlich	56	2	Krankenhaus
Proband D	Weiblich	54	0,5	Unbekannt
Proband E	Männlich	20	1	I.v. Drogen
Proband F	Weiblich	19	1	fraglich Zahn-OP
Proband G	Männlich	50	13	I.v. Drogen
Proband H	Weiblich	58	1	Eigenbluttherapie
Proband I	Weiblich	36	1,5	Sexuell
Proband J	Männlich	26	9	I.v. Drogen
Proband K	Weiblich	59	0,2	Eigenbluttherapie
Proband L	Männlich	61	2,5	Krankenhaus
Proband M	Männlich	29	9	I.v. Drogen
Proband N	Weiblich	62	6	Krankenhaus
Proband O	Weiblich	36	11	Bluttransfusion
Proband P	Männlich	37	x	Unbekannt
Proband Q	Weiblich	51	10	Unbekannt
Proband R	Weiblich	47	x	Unbekannt

Bei den mit „x“ gekennzeichneten Kästen lag uns keine Information vor.

Als Einschlusskriterium für die Gruppe der HCV ausgeheilten galt eine durchgemachte und ausgeheilte Hepatitis-C-Infektion mit dementsprechendem negativen HCV RNA Status und positiver HCV-Antikörperserologie zum Zeitpunkt der Blutspende.

Als Ausschlusskriterien galten ein positiver HCV RNA Status zum Zeitpunkt der Blutspende, eine bereits vorhandene Leberzirrhose oder ein Leberzellcarcinom, eine stattgefunden Lebertransplantation, eine gleichzeitig bestehende Hepatitis-B-Infektion sowie eine medikamentöse Therapie der Hepatitis C.



### 2.1.1.3 Exponierte Probanden

Die Gruppe der gesunden exponierten Personen enthielt 16 Personen. Darunter befanden sich 11 Frauen und 5 Männer.

Von 13 Personen aus dieser Gruppe sind die jeweiligen chronisch erkrankten Ehepartner in der Gruppe der chronisch infizierten Probanden aufgelistet.

Das Durchschnittsalter bei Blutspende lag in dieser Gruppe bei 51 Jahren.

Alle Personen waren entweder verheiratet oder lebten in einer eheähnlichen Partnerschaft mit einer an chronischer Hepatitis C erkrankten Person.

Dies beinhaltete das Leben in einem gemeinsamen Haushalt und die damit verbundenen Risikofaktoren.

Ausschlusskriterien für diese Gruppe waren die Erkrankung an Hepatitis C oder B.

Die Probanden wurden alle negativ auf Anti-HCV-Antikörper getestet. Bei 12 Probanden wurde zusätzlich eine Serumprobe auf HCV RNA negativ getestet. Auf Anti-HCV-Antikörper wurde mittels EIA getestet. HCV RNA wurde mittels Polymerasekettenreaktion gesucht. Beide Untersuchungen wurden am Max-von-Pettenkofer-Institut München durchgeführt.

<b>Proband</b>	<b>Alter bei Blutspende</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Anti-HCV-Antikörper</b>	<b>HCV RNA</b>
Proband A	34	weiblich	negativ	negativ
Proband B	x	männlich	negativ	n. untersucht
Proband C	34	weiblich	negativ	n. untersucht
Proband D	47	weiblich	negativ	negativ
Proband E	65	weiblich	negativ	negativ
Proband F	50	weiblich	negativ	negativ
Proband G	33	weiblich	negativ	negativ
Proband H	55	männlich	negativ	negativ
Proband I	61	weiblich	negativ	negativ
Proband J	54	männlich	negativ	negativ
Proband K	41	weiblich	negativ	negativ
Proband L	55	männlich	negativ	negativ
Proband M	79	männlich	negativ	negativ
Proband N	55	weiblich	negativ	negativ

Proband O	40	weiblich	negativ	n. untersucht
Proband P	55	weiblich	negativ	n. untersucht

#### 2.1.1.4 Chronisch infizierte Ehepartner

Nachfolgend werden die an Hepatitis C chronisch erkrankten Ehepartner der exponierten Probanden charakterisiert. Diese Probandengruppe umfasste 13 Personen, hiervon 8 Männer und 5 Frauen. Von 3 der 16 exponierten Probanden konnte der Partner nicht identifiziert werden, daher finden sich in dieser Gruppe nur 13 Personen. Für die immunologischen Experimente wurde Zellen von den Probanden A bis H verwendet, sowie von 2 weiteren chronisch erkrankten HCV Patienten, somit standen uns Zellen von 10 chronisch erkrankten HCV Patienten zur Verfügung. Das durchschnittliche Alter bei Blutabnahme lag in dieser Gruppe bei 56 Jahren.

Alle Personen sind Patienten der hepatologischen Ambulanz der Medizinischen Klinik II des Klinikums Großhadern und waren bereit zu Studienzwecken Blut zu spenden. Einem hierzu gestellten Ethikantrag wurde durch die Ethikkommission der LMU stattgegeben.

4 Probanden waren bei Blutabnahme aus unterschiedlichen Gründen noch untherapiert. Die anderen 6 Probanden hatte alle eine erfolglose Therapie mit der Kombination Ribavirin und Interferon erhalten.

Einschlusskriterium für diese Gruppe war eine bekannte chronische Hepatitis-C-Viruserkrankung. Ausschlusskriterien waren eine bereits bestehende Leberzirrhose oder ein Hepatozelluläres Carcinom, eine durchgeführte Lebertransplantation sowie eine gleichzeitige Hepatitis B Erkrankung.

<b>Partner</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Genotyp</b>	<b>GPT</b>	<b>HCV RNA (IU/ml)</b>
Proband A	männlich	1a	31	390.000
Proband B	männlich	1a	67	300.000
Proband C	männlich	1a	94	16.800
Proband D	weiblich	1b	113	150.000
Proband E	männlich	1b	100	300.000
Proband F	weiblich	1a	76	200.000
Proband G	weiblich	1b	82	1,3 Mio.
Proband H	männlich	1b	150	6,2 Mio.
Partner I	weiblich	1a	146	6,12 Mio.
Partner J	weiblich	1b	34	250.000
Partner K	männlich	1b		1,4 Mio.
Partner L	männlich		68	positiv
Partner M	männlich	1b	101	7,9 Mio.

### 2.1.2 Gruppengröße

Die Gruppengröße variiert zwischen den verschiedenen Untersuchungsgruppen und Versuchen deutlich, sie liegt allerdings immer unter 16 Personen pro Gruppe pro Versuch. Somit handelt es sich stets um sehr kleine Fallzahlen. Aufgrund der kleinen Fallzahlen war es nicht möglich, von normalverteilten Kollektiven auszugehen. Zur Ausrechnung der statistischen Signifikanz wurden schlussfolgernd parameterfreie Tests verwendet, wie der Mann-Whitney-U-Test.

### 2.1.3 Allgemeiner Laborbedarf

Laborbedarf	Hersteller
Hirschmann Pipettus	Hirschmann Laborgeräte, GmbH, Eberstadt, Deutschland
Serologische Pipetten zu 2mL, 5ml, 10ml	Sarstadt AG, Nürnberg, Deutschland
Mikropipette Eppendorf Research 2µl-10µl; 20µl-200µl; 100µl-1000µl	Eppendorf , Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen steril 20µl, 200µl	Sarstedt AG, Nürnberg, Deutschland
Pipettenspitzen steril 100µl-1000µl	Biochrom, Berlin, Deutschland
Zentrifugenröhrchen, steril zu 15ml	Biochrom, Berlin, Deutschland
Zentrifugenröhrchen, steril zu 50ml	Biochrom, Berlin, Deutschland
Reagiergefäß zu 1,5 und 2ml Safe Seal mit anhängendem Deckel	Sarstedt AG, Nürnberg, Deutschland
Kryoröhrchen mit Außengewinde 2ml, steril	Sarstedt AG, Nürnberg, Deutschland
Röhre 5ml geeignet für FACS Canto	Sarstedt AG, Nürnberg, Deutschland
Zellkulturplatten 96-well rund, steril	Biochrom, Berlin, Deutschland
Zellkulturplatten 24-well flach, steril	Biochrom, Berlin, Deutschland
MiniMACS Trennsäulen Typ MS	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland

### 2.1.4 Geräte

Gerät	Hersteller
Zentrifuge „Rotina 420R“	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge „Mikro 22“	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Abzug „LaminAir“	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Inkubator „HERAcell 240“	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland

### 2.1.5 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Penicillin/Streptomycin 10mg/ml	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Sodium Pyruvate	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Vibrant CFDA SE Cell Tracer Kit	Invitrogen
Brefeldin A	eBioscience, San Jose, CA
BD Golgi Stop Protein Transport Containing Monensin	BD Bioscience, San Jose, CA
Phytohemagglutinin (PHA) L	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

### 2.1.6 Lösungen

Lösung	Hersteller
Fetal Bovine Serum (FBS) Superior	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Phosphate Buffered Saline (PBS) Dulbecco	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Biocoll Separating Solution mit 10mM HEPES	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
<u>MACS-Buffer:</u> PBS Dulbecco mit 0,5% Bovine Serum Albumin & 2mM EDTA	BiochromAG, Berlin, Deutschland
IC Fixation Buffer	eBioscience, San Diego, CA
10 * Permeabilization Buffer	eBioscience, San Diego, CA
Formaldehyd-Lösung 37%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland

### 2.1.7 Medien

Medium	Zusammensetzung
Standardzellkultur Medium	RPMI 1640 (low endotoxin) Flüssigmedium mit 2 mM stabilem Glutamin (Biochrom AG, Berlin), 50mg/500ml Penicillin/Streptomycin, 1mM Sodium Pyruvate
Auftaumedium	90% RPMI 1640 / 10% FBS
Einfriermedium	90% FBS / 10% DMSO
CFSE Waschmedium	5% FBS / 95% PBS Dulbecco
5% AB-Medium	Standardzellkulturmedium mit 5% humanem Serum von Blutgruppe AB-Spendern

### 2.1.8 Antikörper

Antihuman Antikörper	Clone	Isotyp	Bezugsstelle
CD3 PerCp	SK7	IgG1 κ	BD Bioscience, San Jose, CA
CD4 FITC	SK3	IgG1 κ	BD Bioscience, San Jose, CA
CD4 APC	SK3	IgG1 κ	BD Bioscience, San Jose, CA
CD4 APC-H7	RPA-T4	IgG1 κ	BD Bioscience, San Jose, CA
CD14 PerCp	M?P9	IgG2b κ	BD Bioscience, San Jose, CA
CD19 PerCp	SJ5C1	IgG1 κ	BD Bioscience, San Jose, CA
Via Probe PerCp	x	x	BD Bioscience, San Jose, CA
IFN $\gamma$ PE	4S.B3	IgG1 κ	eBioscience, San Diego, CA
CD25 APC	M-A251	IgG1 κ	BD Bioscience, San Jose, CA
CD 154	89 - 76	IgG1 κ	BD Bioscience, San Jose, CA

### 2.1.9 Tetramere

Folgende iTA $\gamma$  MHC Klasse II Tetramere der Firma BECKMAN COULTER wurden verwendet:

HLA	Aminosäuresequenz	Fluoreszenz
DRB1* 1501	GINAVAYYRGLDVSV	PE
DRB1* 1501	NFPYLVAYQATVCARA	PE
DRB1* 0101	TLLFNILGGWVAA	PE

### 2.1.10 Proteine

Die folgenden HCV Proteine wurden von Chiron Corp., Emeryville, CA, USA hergestellt und waren gelöst in DMSO auf eine Konzentration von 1 mg/ml.

Aminosäuresequenz	HCV Protein
1192-1457	NS3
1569- 1931	NS4
2054-2995	NS5
2- 120	Core

Folgende Proteine wurden zur Positiv- beziehungsweise Negativkontrolle verwendet.

Proteinname	Bezugsfirma	Kontrollfunktion
Superoxiddismutase (SOD)	Chiron Corp., Emeryville, CA, USA	Negativkontrolle
Tetanustoxin	Chiron Corp., Emeryville, CA, USA	Positivkontrolle
Staphylokokkusenterotoxin B (SEB)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA	Positivkontrolle

### 2.1.11 Peptide

Die folgenden HCV Peptide wurden von EMC Microcollections GmbH, Tübingen bezogen, in einer Konzentration von 1mg/ml.

Aminosäuresequenz	HLA Kompatibilität
GINAVAYYRGLDVSV	DRB1* 1501/1502
NFPYLVAYQATVCARA	DRB1* 1501/1502
TLLFNILGGWVAA	DRB1* 0101/0102



## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Isolierung von PMBC aus Blut

Den Probanden wurde 30-40ml Blut in Heparinröhrchen abgenommen. Die PMBC wurden mit Hilfe eines Ficoll-Dichtegradienten aus dem Blut isoliert. Hierbei handelt es sich um eine Polysuccrose, deren Dichte es ermöglicht durch Zentrifugation Mononukleäre Zellen von Erythrozyten, Thrombozyten und toten Zellen zu trennen.

In speziellen 50ml Ficoll-Gefäßen, welche mit einer Trennmembran versehen sind, wurde 20ml Ficoll vorgelegt und kurz anzentrifugiert.

Das Heparinblut wurde vorsichtig in die Ficoll Falcons überführt und bis zu einer Gesamtmenge von 50ml mit PBS Lösung aufgefüllt. Es folgte eine Zentrifugation bei 1000rpm für 10 Minuten ohne Bremse. Die sich nun gebildete Interphase mit den hier angereicherten Mononukleären Zellen wurde in ein neues 50ml Falcon pipettiert und wieder bis zu einer Menge von 50ml mit PBS Lösung aufgefüllt. Die nun isolierten Zellen wurden zweimal bei je 310rpm für 15 Minuten gewaschen und zuletzt in 5 ml AB-Medium resuspendiert.

### 2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 mit Tryptanblau gefärbt. Bei diesem Verfahren diffundiert die blaue Farbe bei Beschädigung der Zellmembran ins Zellinnere, sodass tote Zellen im Mikroskop leicht erkennbar sind und man sicher gehen kann nur vitale Zellen zu zählen. Nach einer kurzen Einwirkzeit wurde die Zellsuspension in die Neubauer-Zählkammer gegeben. Ausgezählt wurden in der Neubauer-Zählkammer mindestens 2 Eckquadrate, bestehend aus je 16 kleineren Quadraten. Damit sollte einer eventuellen statistischen Ungenauigkeit des einzelnen Eckquadrats vorgebeugt werden.

Die endgültige Zellkonzentration ergab sich durch das Produkt aus dem gezählten Wert und dem Kehrwert des Produkts aus Quadratfläche und Kammerhöhe.

### 2.2.3 Kryokonservierung von Zellen

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen durch 5-minütige Zentrifugation bei 310rpm von ihrem Medium getrennt. Danach wurden die Zellen in FCS resuspendiert, mit einer Konzentration von 1,35ml FCS /  $20 \cdot 10^6$  Zellen. Um den Zellstoffwechsel zu bremsen wurden die Zellen nun 30 Minuten auf Eis gestellt. Nach der Kühlzeit wurden 0,15ml DMSO

zugegeben, sodass sich eine Endzusammensetzung von 11% DMSO zu 89% FCS ergab. Nach einer raschen Umfüllung in Kryovials wurden die Zellen für 24 - 48h bei -80°C eingefroren und nachfolgend in den Stickstofftank bei -196°C eingelagert.

#### **2.2.4 Rekultivierung von kryokonservierten Zellen**

Zur Rekultivierung der kryokonservierten Zellen wurden diese im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und schnell in 10ml eines 10% FCS /90% RPMI Mediums überführt. Danach folgte die erste Zentrifugation bei 310rpm für 15 Minuten. Nach Abkippen des Mediums wurden die Zellen in 10ml RPMI Medium resuspendiert und wiederum bei 310rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Zuletzt wurden die Zellen in 3ml AB-Medium resuspendiert und mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer gezählt.

#### **2.2.5 Lymphozytäre CD154 Expression und IFN $\gamma$ -Sekretion nach 15-stündiger Antigenstimulation**

##### **2.2.5.1 Prinzip**

Mit folgender Methode wurde die Antigen spezifische T-Zell-Antwort nach kurzzeitiger *in vitro* Antigenstimulation beurteilt. Sie basiert auf der Analyse der Expression von CD154 auf T-Zellen. Diese Möglichkeit wurde erstmals 2005 von Frentsch, Chattepadhyay et al. beschrieben [66] und 2006 in Nature Protocols detailliert dargestellt [67].

CD154, oder CD40L, ist ein Typ II Transmembranprotein der TNF Familie und wird auf aktivierten T-Zellen exprimiert [68]. Durch die Interaktion mit seinem Co-Liganden CD40 wird eine Immunkaskade in Gang gesetzt [68]. Mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen CD154 wird die Herunterregulation von CD154 nach Interaktion mit CD40 verhindert und die CD154 Expression kann quantifiziert werden. Hierdurch lassen sich Rückschlüsse auf die quantitative Aktivierung spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen ziehen.

Dieser Ansatz erlaubt zudem gleichzeitig die Darstellung des Zytokinmusters der untersuchten aktivierten T-Helfer-Zellen. Hier wurde das von Lamoreaux et al. beschriebene Protokoll zur Intrazellulärfärbung zur Grundlage genommen [69].

### 2.2.5.2 Ansatz

Für den Ansatz wurden frisch aufgetaute PBMC verwendet. Pro Antigen wurden  $1-1,5 \cdot 10^6$  Zellen verwendet und in 1,5ml Reagenzgefäße gefüllt. Das Monensinmedium wurde in einer Konzentration von 0,7µl Monensin/ml AB-Medium vorbereitet. Die verwendeten Proteine wurden in je 200µl dieses Monensin-AB-Mediums gelöst:

Protein NS3, NS4, NS5 und Core mit einer Menge von 0,7µg (3,5µl/ml) ,

die Positivkontrollen Tetanustoxin mit 2µg (10µl/ml) und SEB mit 0,4µg (2µl/ml).

Die Zellen wurden bei 310rpm für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgesaugt und die Zellen in dem jeweiligen Antigenmedium resuspendiert. Zuletzt wurden die Zellen in eine 96-Lochplatte pipettiert und je 20µl des CD154 hinzugegeben.

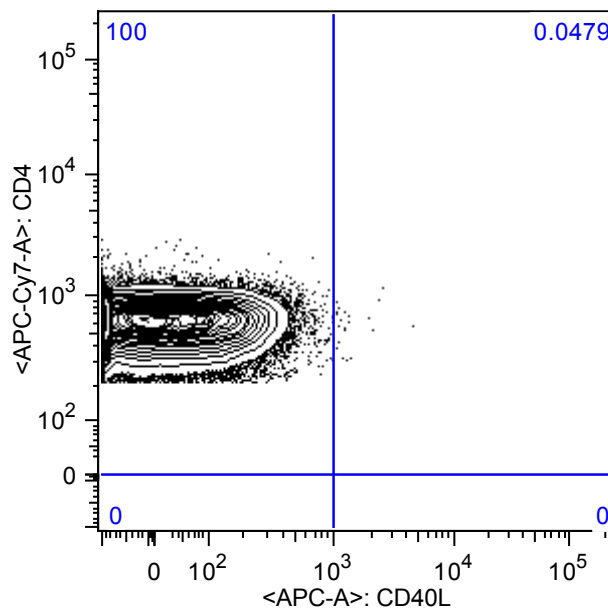
Nun folgte eine 15-stündige Inkubation bei 37°C im Brutschrank.

Nach der 15-stündigen Inkubation wurden die Zellen geerntet und in ein mit 800µl MACS Buffer gefülltes Reagenzgefäß überführt. Die Platte wurde anschließend mit 200µl MACS Buffer gespült. Als nächstes wurden die Zellen bei 800 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und in 50-100µl des Überstandes resuspendiert. Die nachfolgende Oberflächenfärbung wurde mit 3µl CD3 PerCp und 3µl CD4 APC-H7 durchgeführt. Nach einer 20-minütigen Inkubation in Dunkelheit und bei 4°C wurden die Zellen mit 1ml MACS Buffer gewaschen (310rpm, 5 Minuten). Um die Zelloberflächenepitope zu erhalten wurde als nächstes eine Oberflächenfixierung mit 100µl Fixation Buffer durchgeführt. Dafür wurde der Fixation Buffer zu den Zellen gegeben, beides schnell gemischt und anschließend wiederum für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der Inkubationszeit wurde der „Permeabilization Buffer“ vorbereitet. Hierfür wurde der 10-fach konzentrierte Permbuffer mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnt. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit je 1ml Permbuffer bei 310rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Als nächstes wurden die Zellen mit 1µl Anti-IFN $\gamma$  PE gefärbt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen wiederum mit 1ml Permbuffer gewaschen und zuletzt in 200µl 1%Formalin fixiert.

### 2.2.5.3 Auswertung

Bei der Auswertung wurde als erstes die Lymphozytenpopulation in der FSC-SSC Darstellung identifiziert. Im nächsten Schritt konnte durch Auftragen der CD3-Antikörper gegenüber den CD4-Antikörpern die Gruppe der CD3+ und CD4+ Zellgruppe markiert

werden. Mit Hilfe der CD154 Isotypenkontrolle konnte nun die maximale Signalintensität festgelegt werden, die über unspezifische Antikörperbindung und Autofluoreszenz generiert werden kann. Alle Zellen, die über diesem Schwellenwert lagen wurden als CD154 positiv festgelegt. Weitere Qualitätsschritte waren die unabhängige Auswertung von 2 Personen, sowie die in jedem Versuch verwendeten Positiv- und Negativkontrollen. Somit wurde die Population der CD4<sup>+</sup> und CD154<sup>+</sup> Zellen quantifiziert. Diese Population wurde nachfolgend auf ihre IFN $\gamma$  Produktion untersucht.



**Abbildung 2.2** Darstellung der gating Strategie zur Identifizierung der CD154 (CD40L) positiven Zellen. Nach Auswahl des Lymphozytengates wurden CD3<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> Zellen identifiziert. Nachfolgend wurde wie hier dargestellt, die CD154 Expression auf der x-Achse aufgetragen, während CD4 Expression auf der y-Achse aufgetragen wurde. Mit Hilfe der Isotypenkontrolle wurde der Schwellenwert ab dem von einer positiven CD154 Antwort ausgegangen werden konnte festgelegt. Der prozentuale Anteil an CD154 positiven Zellen an allen CD4<sup>+</sup> konnte nun quantifiziert werden. Zur Auswertung der durchflusszytometrischen Daten wurde das Programm FlowJo 8.8.6 der Firma Tree Star, Inc. verwendet.

## 2.2.6 Proliferationsassay mit Carboxyfluorescein-Diacetate Succinimidylester (CFSE)

### 2.2.6.1 Prinzip des CFSE Proliferationsassays

Um die Zellproliferation der Lymphozyten nach Antigenstimulation zu beobachten, wurden frisch aufgetaute PBMC mit einem Fluoreszenzfarbstoff gefärbt. Dieser Farbstoff verteilt sich bei Zellteilung gleichmäßig auf beide Tochterzellen, sodass die Zellteilungsrate mittels Durchflusszytometrie ermittelt werden kann [74]. Das zunächst farblose CFDA-SE (Carboxyfluorescein-Diacetate Succinimidylester) ist ein hydrophobes Molekül, das durch die Zellmembran ins Zellinnere diffundieren kann. Durch intrazelluläre Esterasen werden die beiden Acetatreste abgespalten und das grün fluoreszierende CFSE entsteht. Es bindet kovalent an Lysin- und Argininreste zytoplasmatischer Proteine. CFSE kann die Zellmembran nicht mehr passieren und verbleibt demnach in jeder Tochterzelle. Die Methode ermöglicht es, so zwischen 8 und 10 Zellteilungen zuverlässig nachzuverfolgen, bevor sich das Signal mit der Hintergrundfluoreszenz vermischt [75] [76].

Diese Methode zur Detektion proliferierender Lymphozyten wurde erstmals von Lyons et. al. beschrieben [77].

### 2.2.6.2 Ansatz des CFSE Proliferationsassays

Für den Proliferationsassay wurden  $0,5 \cdot 10^6$  Zellen pro Ansatz verwendet. Die Zellen wurden zuerst nach zuvor beschriebener Methode aufgetaut und gezählt.

Um die zelltoxische Eigenschaft von CFDA zu minimieren wurde 5% FCS Lösung vorbereitet. Nach der Zentrifugation wurden die  $4,5 \cdot 10^6$  Zellen in 1ml dieser 5% FCS Lösung resuspendiert. Zu den Zellen wurde CFDA in einer Endkonzentration von  $5 \mu\text{M}$  hinzugefügt und durch schnelles Mischen gleichmäßig verteilt. Es folgte eine 5-minütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur und im Dunkeln. Zu den Zellen wurde 10ml der 5%FCS Lösung gegeben und es folgte eine 12-minütige Zentrifugation bei 310 rpm. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt und die Zellen anschließend in AB-Medium aufgenommen. Pro Ansatz wurden 2ml AB-Medium verwendet, sodass eine Konzentration von  $0,25 \cdot 10^6$  Zellen/ml AB-Medium erreicht wurde.

Nun wurden die HCV Proteine in einer Konzentration von  $3,5 \mu\text{g/ml}$  AB-Medium zugegeben. Als Positivkontrollen dienten Tetanustoxin in einer Konzentration von  $10 \mu\text{g/ml}$  AB-Medium, beziehungsweise Phytohämagglutinin (PHA) ebenfalls zu  $10 \mu\text{g/ml}$  AB-Medium.

Die Zelllösung wurde auf einer 96-Loch Zellkulturplatte verteilt, sodass sich rein rechnerisch je  $0,2 \cdot 10^6$  Zellen pro Loch befanden.

Die Zellen wurden für 5 Tage bei 37°C inkubiert.

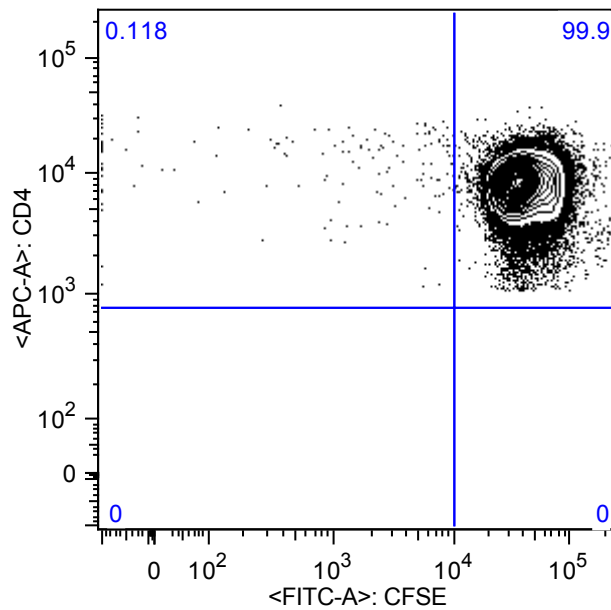
Nach der 5-tägigen Inkubation wurden die Zellen aus der 96-Loch Zellkulturplatte geerntet und diese mit je 200µl PBS gespült. Anschließend folgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 310rpm. Das Medium wurde abgekippt, die Zellen resuspendiert und mit folgenden Antikörpern gefärbt:

Je 2µl CD14 PerCp, je 2µl CD19 PerCp, je 10 µl Viaprobe PerCp, je 3 µl CD4 APC.

Es folgte eine 20-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Zuletzt wurden die Zellen mit 1ml MACS bei 310rpm wiederum 5 Minuten zentrifugiert und schließlich in 200µl 1% Formalin fixiert. Bis zur anschließenden Messung mittels Durchflusszytometrie wurde die Zellsuspension bei 4°C in Dunkelheit gelagert.

### **2.2.6.3 Auswertung**

Für die Auswertung wurde zuerst im FSC-SSC-Fenster die Lymphozytenpopulation identifiziert. Nach Auswahl der CD14, CD19 sowie Viaprobe negativen Zellen blieb die Population der CD4+ Lymphozyten übrig. Diese Zellen wurden in einem Graphen mit der Fluoreszenz des CD4-Antikörpers auf der y-Achse und der Fluoreszenz des CFSE auf der x-Achse dargestellt. Durch die Einteilung des Feldes in 4 Quadranten konnte die CD4+ und CFSE+ Population quantifiziert werden. Der Schwellenwert ab dem eine CFSE Positivität festgelegt wurde, wurde anhand der Negativkontrolle SOD, sowie der Positivkontrolle PHA festgelegt. Somit konnte nach der Auswertung der prozentuale Anteil der sich geteilten Zellen genannt werden sowie eine Aussage über die Quantität der Teilungen gemacht werden.



**Abbildung 2.3** Darstellung der gating Strategie zur Identifizierung der CFSE positiven und somit proliferierten Zellen. Nach Auswahl des Lymphozytengates wurden CD14, CD19 sowie Viaprobe negative Zellen und identifiziert. Übrig blieb somit die Population der CD4+ Lymphozyten. Nachfolgend wurde, wie hier dargestellt, die CFSE Expression auf der x-Achse aufgetragen, während CD4 Expression auf der y-Achse aufgetragen wurde. Mit Hilfe der Positivkontrolle PHA wurde der Schwellenwert ab dem von einer positiven CFSE Antwort ausgegangen werden konnte festgelegt. Der prozentuale Anteil an CFSE positiven Zellen an allen CD4+ konnte nun quantifiziert werden. Zur Auswertung der durchflusszytometrischen Daten wurde das Programm FlowJo 8.8.6 der Firma Tree Star, Inc. verwendet.

## 2.2.7 14-tägige Zellkultur mit anschließender Restimulation durch feeder-Zellen zur Messung der lymphozytären IFN $\gamma$ Antwort

### 2.2.7.1 Prinzip

Folgender Ansatz wurde gewählt, um die Interferon- $\gamma$  Antwort einer Zelllinie zu charakterisieren, welche 14 Tage mit einem HCV Antigen stimuliert wurde.

Interferon- $\gamma$  nimmt eine zentrale Rolle in der Immunantwort ein. Es erhöht durch Hochregulation von MHC-I-Molekülen das Potential für die Antigenerkennung von Zytotoxischen T-Zellen, durch Hochregulation von MHC-II-Molekülen in antigenpräsentierenden Zellen die Möglichkeit einer peptidspezifischen Aktivierung von CD4+ T-Zellen und ist für die Rekrutierung der Zellen des angeborenen Immunsystems verantwortlich [78].

Die am Tag 14 durchgeführte Intrazellulärfärbung wurde anhand des Protokolls von Lamoreaux et al. durchgeführt [69].

### 2.2.7.2 Ansatz

Es wurden PBMC nach vorher beschriebener Methode aufgetaut. Für die Zelllinie wurden 3 Millionen Zellen in 1ml AB-Medium aufgenommen und in 1 Loch einer 24-Loch-Zellkulturplatte pipettiert. Nun wurde zu den Zellen, passend zu dem jeweiligen HLA des Probanden, je 10µg des Antigens hinzugefügt. Bei Probanden mit dem HLA DRB1\* 0101 wurde das HCV Peptid mit der Aminosäuresequenz TLLFNILGGWVAA verwendet. Probanden mit dem HLA Typ DRB1\*1501/1502 wurden mit den passenden Peptiden mit den Aminosäuresequenzen GINAVAYYRGLDVSV sowie NFPYLVAYQATVCARA stimuliert. Anschließend folgte eine 14-tägige Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank.

An Tag 7 wurde die Zellkultur mit 1µl IL-2 stimuliert. An den folgenden Tagen wurde abhängig von der Indikatorfarbe des Mediums entschieden, ob die Zellen nochmals mit 300µl IL-2-haltigen Mediums stimuliert werden müssen.

Zur nötigen Antigenrestimulation an Tag 14 wurden an Tag 13 autologe feeder-Zellen generiert. Hierfür wurden PBMC des jeweiligen Probanden aufgetaut und für 3200 Sekunden mit 40 Gray bestrahlt. Durch die Bestrahlung sind die Zellen in ihrer Teilungsfähigkeit stark eingeschränkt. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

An Tag 14 wurden die feeder-Zellen ausgezählt und in einer Konzentration von circa 750000 Zellen/100µl in AB Medium aufgenommen. Pro Ansatz wurden 100µl dieser Zellsuspension in eine 96-Loch-Zellkulturplatte überführt.

Das zur Restimulation verwendete Brefeldin-A-Medium bestand aus 100µl AB-Medium und 2µl Brefeldin/ml AB-Medium. In dieser Zusammensetzung diente es als Kontrollmedium. Für die Positivkontrolle wurde SEB in einer Konzentration von 0,2µl/100µl Brefeldin-A-Medium verwendet. Das HCV Peptid wurde zu 2µg/100µl Brefeldin-A-Medium konzentriert. Die Zellen aus der Zelllinie wurden nun geerntet, zweimal bei je 310rpm gewaschen und in 100µl des jeweiligen Mediums resuspendiert. Nun wurden sie schnell zu den feeder Zellen in der Zellkulturplatte überführt. Es folgte eine Inkubation von 6 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen in ein mit 800µl MACS Buffer gefülltes Reagiergefäß geerntet. Als nächstes folgte eine Zentrifugation bei 310rpm für 10 Minuten. Die Zellen wurden in circa 100µl Überstand resuspendiert. Für die Oberflächenfärbung wurde 3µl CD3 PerCp und 3µl CD4 APC-H7 verwendet. Die Zellen wurden die nächsten 20 Minuten bei 4°C und in Dunkelheit inkubiert und danach mit 1ml MACS Buffer bei 310rpm für 5 Minuten gewaschen. Die folgende Oberflächenfixierung wurde nach vorsichtigem



Absaugen mit 100µl Fixationsbuffer vollzogen und die Zellen wiederum für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der Inkubationszeit wurde der Permeabilization Buffer vorbereitet. Hierfür wurde der 10-fach konzentrierte Permbuffer mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnt.

Nach der Inkubation wurden die Zellen mit je 1 ml des vorbereiteten Permeabilization Buffer zweimal bei 310rpm für 5 Minuten gewaschen.

Als nächstes wurden die Zellen mit 1µl Anti-IFN $\gamma$  PE gefärbt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

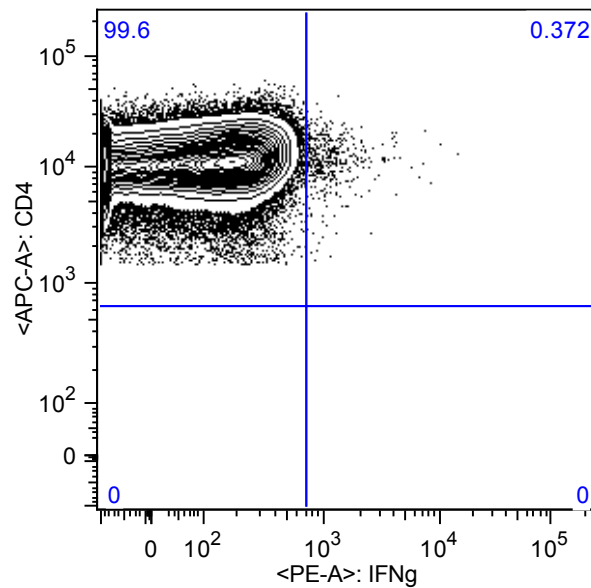
Nachfolgend wurde ein letztes Mal gewaschen mit 1ml Permeabilization Buffer.

Nach sorgfältigem Absaugen und Resuspendieren, wurden die Zellen in 200µl 1%Formalin fixiert.

Bis zur Messung mittels FACS wurden die Zellen im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

### **2.2.7.3 Auswertung**

Für die Auswertung wurde zuerst die Lymphozytenpopulation in der FSC-SSC Darstellung identifiziert. Nachfolgend wurde die CD3<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> Zellpopulation in einem nächsten Fenster dargestellt. Diese Population wurde nun weiter auf ihre IFN $\gamma$  Zytokinproduktion untersucht. Hierfür wurde anhand der Positivkontrolle SEB und der Negativkontrolle der Schwellenwert festgelegt, ab welchem von positiver IFN $\gamma$  Antwort ausgegangen werden konnte.



**Abbildung 2.4** Darstellung der gating Strategie zur Identifizierung der IFN $\gamma$  positiven Zellen. Nach Auswahl des Lymphozytengates wurden CD3 $^{+}$  und CD4 $^{+}$  Zellen identifiziert. Nachfolgend wurde, wie hier dargestellt, die IFN $\gamma$  Expression auf der x-Achse aufgetragen, während die CD4 Expression auf der y-Achse aufgetragen wurde. Mit Hilfe der Positivkontrolle SEB wurde der Schwellenwert ab dem von einer positiven IFN $\gamma$  Antwort ausgegangen werden konnte festgelegt. Der prozentuale Anteil an IFN $\gamma$  positiven Zellen an allen CD4 $^{+}$  konnte nun quantifiziert werden. Zur Auswertung der durchflusszytometrischen Daten wurde das Programm FlowJo 8.8.6 der Firma Tree Star, Inc. verwendet.

## 2.2.8 14-tägige Zellkultur mit HLA Klasse-II-Tetramerfärbung

### 2.2.8.1 Prinzip

Zur Untersuchung HCV spezifischer CD4 $^{+}$  T-Zellen in PBMC nach 14 tägiger Stimulation mit HCV Peptiden wurden Tetramerfärbungen vorgenommen.

Die Methode ermöglicht eine direkte Detektion HCV spezifischer CD4-T-Zellen.

Die MHC-II-Tetramere bestehen aus 4 MHC-Klasse-II Molekülen, welche ein HCV Peptid gebunden haben und über Biotin mit Streptavidin und dem fluoreszierenden Phycoerythrin verbunden sind. Damit ist es möglich eine T-Zellpopulation, die spezifisch für ein HCV Peptid ist, zu quantifizieren. Durch die Aufreinigung mit magnetischen Perlen werden kleinste Populationen virusspezifischer Zellen entdeckt und unspezifische Hintergrundfärbungen somit auf ein Minimum reduziert [79].

Die Tetramere wurden HLA-gematched eingesetzt.

Dies bedeutet, dass Zellen der Probanden mit dem HLA DRB1\* 0101 mit dem Tetramer mit dem gebundenen HCV Peptid mit der Aminosäuresequenz TLLFNILGGWVAA und Zellen

der Probanden mit dem HLA DRB1\* 1501 mit den Tetrameren mit HCV Peptiden mit den Aminosäuresequenzen GINAVAYYRGLDVSV sowie NFPYLVAYQATVCARA stimuliert wurden.

#### 2.2.8.2 Ansatz

Für die Zellkultur wurden jeweils 2 Millionen Zellen in 1ml AB-Medium in ein Loch einer 24-Loch-Platte pipettiert.

Abhängig vom HLA der Probanden wurden die PBMC mit den genannten Peptiden in einer Menge von 10µg stimuliert. Dies führte zu einer Endkonzentration von 10µg Antigen/ml AB-Medium. Nun wurden die Zellen in einem Brutschrank mit 37°C und 5,0% CO<sub>2</sub> 6 Tage inkubiert. Am 7. Tag wurde 1µg IL-2 hinzugefügt. Nach ausgiebigem Mischen wurden die Zellen weiter im Brutschrank inkubiert.

Anhand der Farbe des Mediums wurde in den folgenden Tagen im Einzelfall entschieden, zu den Zellen weitere 300µl eines IL-2 Mediums zu pipettieren.

Die Färbung an Tag 14 wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt.

Die Zellen wurden aus der 24-Lochplatte in ein 2ml Reagiergefäß überführt. Nach 5-minütiger Zentrifugation (310rpm, 23°C) wurde das verbleibende Zellpellet in 50-100µl des Überstandes resuspendiert. Nun wurde zu den Zellen 3µl des PE-markierten Tetramers gegeben. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei 23°C in Dunkelheit.

Anschließend wurden die Zellen mit den gewünschten Oberflächenantikörpern gefärbt: CD4 FITC, 2µl CD14 PerCp, 2µl CD19 PerCp, sowie 10µl Viaprobe PerCp.

Hiernach folgte eine weitere Inkubation von 20 Minuten bei 4°C und in Dunkelheit. Nach dieser Antikörperinkubation wurden die Zellen wiederum für 5 Minuten bei 23°C und 310rpm gewaschen. Das Zellpellet wurde in 50-100µl des Überstandes resuspendiert. Als nächstes wurden 15µl der magnetischen MicroBeads hinzugegeben und für 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Die magnetischen Anti-PE-MicroBeads binden an das Phycoerythrin (PE) des Tetramers und spielen eine entscheidende Rolle bei der nachfolgenden Zellseparation mittels MACS-Methode.

In dieser Inkubationszeit wurde der Versuchsaufbau für die Zellseparation vorbereitet. Hierfür wurde eine MACS Säule (Column) auf den magnetischen Separationsständer gesteckt, sodass sich ein magnetisches Feld aufbauen konnte. Die Säule wurde anschließend mit 500µl MACS Buffer vorgespült. Nun wurden 2 Gefäße zum späteren Auffangen der Zellen bereitgestellt. Das eine Gefäß für eine Zellsuspension ohne vorherige Zellseparation mittels MACS Technik, die so genannte pre-probe, das andere Gefäß für Zellen nach Zellseparation mittels

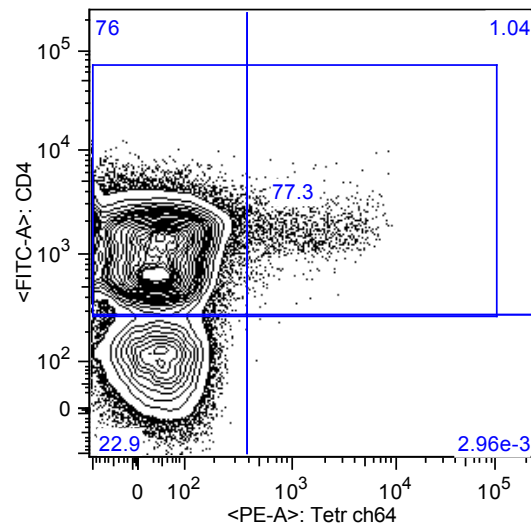
MACS Technik, beziehungsweise post-probe. In die pre-probe wurde 10µl 10%-iges Formalin, in die post-probe 100µl 10%-iges Formalin gegeben.

Nach der Inkubation mit MicroBeads wurde 1 ml MACS-Buffer zu den Zellen gegeben und es folgte eine Zentrifugation bei 310rpm für 5 Minuten. Danach wurden die Zellen in 1ml MACS-Buffer resuspendiert. 100µl dieser Zelllösung wurde in das Gefäß für die nicht selektierte pre-probe gegeben. Diese Probe war hiermit fertig. Der Rest der Zelllösung wurde in die magnetisierte MACS Säule überführt. Nun folgte eine positive Selektion der Zellen, wobei die Tetramer gefärbten Zellen magnetisch in der Säule gehalten wurden. Die Säule wurde 3-mal hintereinander mit je 500µl MACS Buffer gespült. Als letztes wurde die Säule vom Magnetständer genommen, 1ml MACS-Buffer dazugegeben und die aussortierten Zellen mit Hilfe eines Stempels aus der Säule in das post-probe Gefäß gedrückt. Vor der Messung mittels Durchflusszytometrie wurde die Probe nochmals bei 310rpm für 5 Minuten zentrifugiert, anschließend wurden 800µl des Überstandes abgenommen und die Zellen in den verbliebenen 200µl resuspendiert.

Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Analyse.

### **2.2.8.3 Auswertung**

Für die Auswertung wurde zuerst die Lymphozytenpopulation in der FSC-SSC Darstellung identifiziert. Nachfolgend wurde die CD14, CD19 und Viaprobe negative Zellpopulation in einem nächsten Fenster dargestellt. Hier wurde die CD4 Expression auf der y-Achse gegen die Expression von PE-Tetrameren auf der x-Achse aufgetragen. Werte ab denen von einer Tetramer positiven Reaktion ausgegangen wurde, konnten anhand der Positivkontrolle festgelegt werden.



**Abbildung 2.5** Darstellung der gating Strategie zur Identifizierung der MHC-II-Tetramer positiven Zellen. Nach Auswahl des Lymphozytengates wurden alle CD14+, CD19+ und Viability negativen Zellen identifiziert. Nachfolgend wurde wie hier mit dem Beispiltetramer „ch64“ dargestellt, die MHC-II-Tetramer Expression auf der x-Achse aufgetragen, während die CD4 Expression auf der y-Achse aufgetragen wurde. Anhand der pre- und post-Probe wurde der Schwellenwert festgelegt, ab dem von MCH-II-Tetramer positiven Zellen ausgegangen wurde, dieser lag bei 10<sup>2,4</sup>. Der prozentuale Anteil an Tetramer positiven Zellen an allen CD4+ konnte nun quantifiziert werden. Zur Auswertung der durchflusszytometrischen Daten wurde das Programm FlowJo 8.8.6 der Firma Tree Star, Inc. verwendet.

## 2.2.9 Durchflusszytometrie

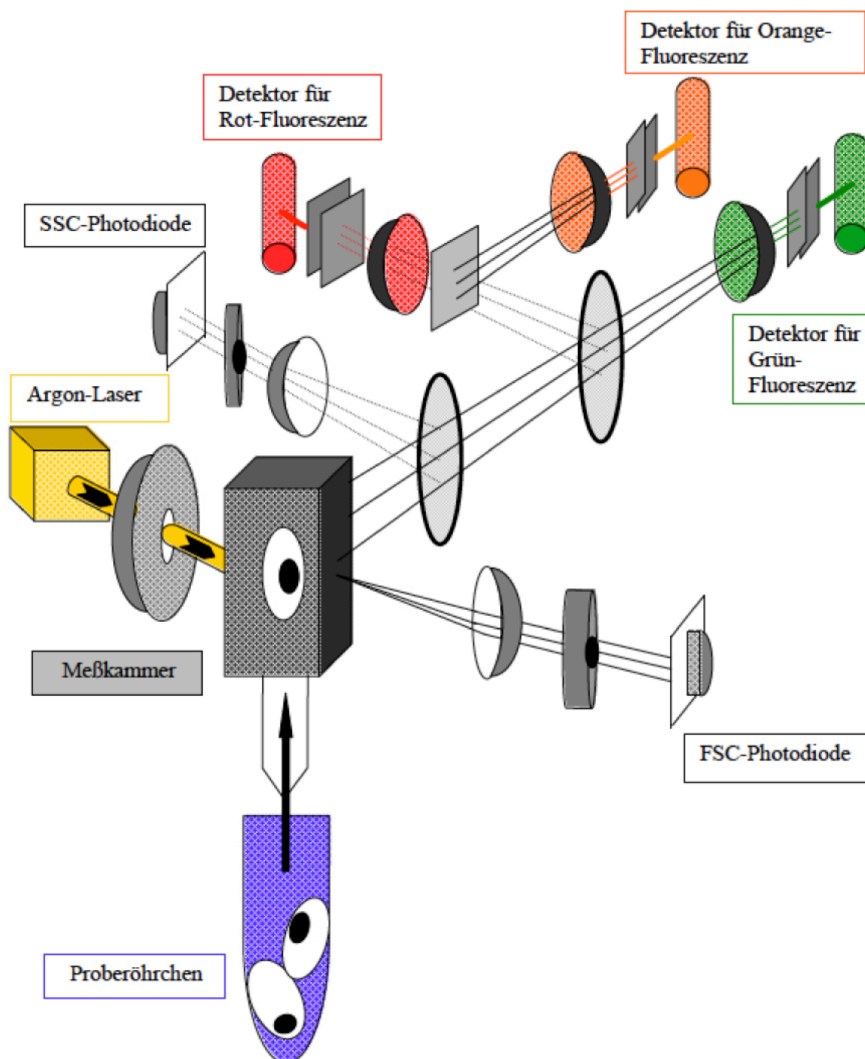


Abbildung 2.6 Darstellung des Aufbaus eines Durchflusszytometers. Quelle: Wood, J.C.S. (1993). Clinical Flow Cytometry Instrumentation. In: Clinical Flow Cytometry. Principles and Applications.

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, die es ermöglicht optische Eigenschaften einzelner Zellen oder Partikel in Suspension zu messen und zu analysieren. Sie zeichnet sich durch eine hohe Analysegeschwindigkeit, eine objektive Quantifizierung, eine hohe Empfindlichkeit sowie auf Grund der großen gemessenen Zellanzahl durch eine große statistische Sicherheit aus.

Das Prinzip dieser Methode besteht darin, dass Zellen und Partikel beim Passieren eines Laserstrahls Streulicht produzieren, welches mit Hilfe von Detektoren aufgefangen wird. Dadurch lassen sich Aussagen bezüglich morphologischer und immunologischer Eigenschaften der Zellen machen.

Das Durchflusszytometer ist das benötigte Gerät zur Messung.

Durch die Vernetzung des Durchflusszytometers mit einem Computer kann nachfolgend eine Auswertung der Daten in Form von Histogrammen oder in einem Koordinatensystem als Konturplots, Dichteplots oder so genannte dot plots aufgetragen werden. Bei der dot plot Darstellung entspricht jeder Punkt in der Graphik einer detektierten Zelle.

Für diese Arbeit wurde das Gerät FACS Canto, der Firma Becton Dickinson aus San Jose, CA, USA verwendet. Als Systemsoftware wurde FACS Diva ebenfalls von Becton Dickinson genutzt. Zur späteren Ausarbeitung der gemessenen Werte wurde die Software FlowJo 8.8.6 der Firma Tree Star Inc. aus Ashland, Oregon, USA verwendet.

Bei der Messung wird die benötigte Zellsuspension mit einer Stahlkapillare ins Innere des Geräts gesaugt. Durch starke Beschleunigung der Zellen entsteht ein Einzelzellstrahl welcher an einem im 90° stehenden Laser vorbeifließt. Jedes Mal wenn eine Zelle den Laserstrahl kreuzt verursacht diese Streulicht. Gemessen wird das Streulicht an 2 Stellen, einmal zur ursprünglichen Richtung des Zellstrahls (forward scatter) und im 90°-Winkel zu diesem (sideward scatter).

Das Vorwärtstreulicht (forward scatter) wird hauptsächlich beeinflusst durch die Größe der vorbei fließenden Zellen. Das Seitwärtstreulicht (sideward scatter) misst die morphologischen Eigenschaften der Zellen, vor allem ihre Granularität. Dadurch lassen sich die Zellen in einer Suspension bezüglich ihrer Größe und Granularität unterscheiden.

Eine genauere Differenzierung der Zellen erreicht man durch Verwendung von Fluorochromgekoppelten Antikörpern, welche Oberflächenantikörper der Zellen binden.

Das emittierte Fluoreszenzlicht wird durch entsprechende Filter geleitet und in Photomultiplier-Röhren elektronisch verstärkt. Die Fluoreszenzintensität ist dabei proportional zur Anzahl der markierten Bindungsstellen auf der Zelloberfläche, das heißt je mehr Antikörper auf der Oberfläche einer Zelle gebunden sind, desto stärker ist das Fluoreszenzsignal.

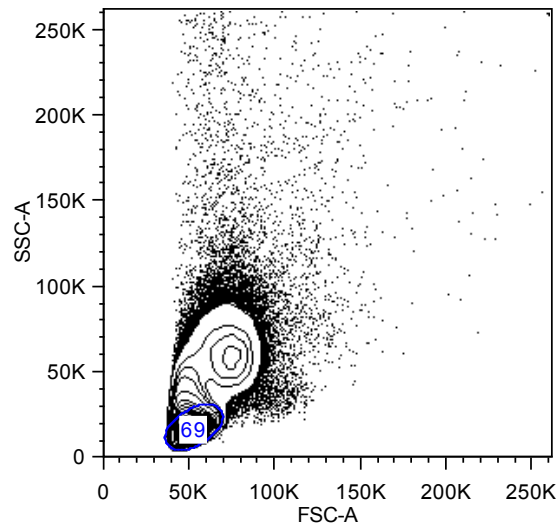
Anschließend an die Messung werden die von den Photodetektoren aufgenommenen optischen Daten prozessiert, in digitale Computer gerechte Daten umgewandelt und können mit Hilfe von Software in Graphen dargestellt werden.

#### **2.2.9.1 Auswertung der durchflusszytometrischen Daten**

Bei der Auswertung der durchflusszytometrischen Daten ist es möglich alle erfassten Daten gegeneinander darzustellen und statistisch auszuwerten.

Für die Auswertung wurde das oben erwähnte Programm FlowJo 8.8.6 der Firma Tree Star Inc. aus Ashland, Oregon, USA verwendet.

Als erstes wurden alle 200.000 gemessenen Zellen in einem dot plot Graphen mit den Achsen forward scatter und sideward scatter gegeneinander dargestellt. Die für die Lymphozytenpopulation charakteristische Position wurde durch ein elektronisches Gate herausgegriffen. Hierdurch konnte bei der weiteren Auswertung gezielt nur diese Population analysiert werden. Von den gemessenen 200.000 Zellen blieben nun etwa 60 – 70% der Zellen übrig.

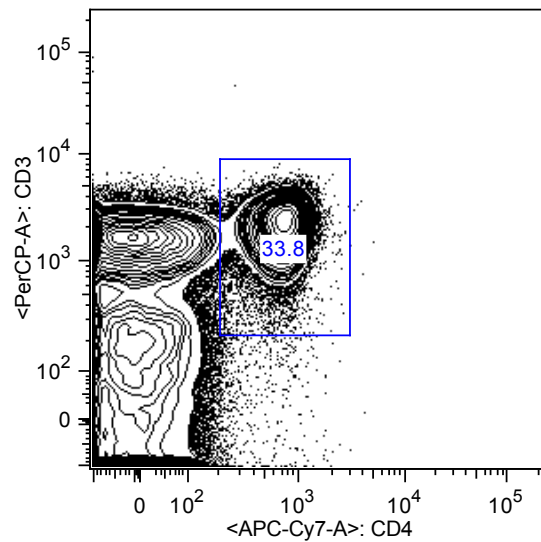


**Abbildung 2.7 Darstellung der Auswahl des Lymphozytengates**

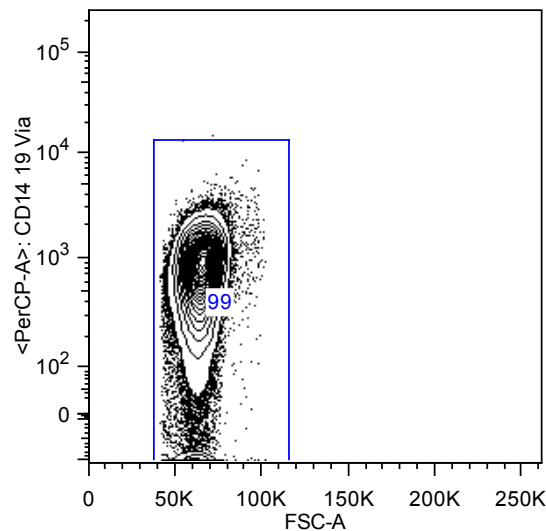
Durch die Bindung von monoklonalen fluoreszenzmarkierten Antikörpern konnten lymphozytäre Subpopulationen anhand von gebundenen Oberflächenmolekülen identifiziert werden.

Hierfür wurden nur die Zellen des vorher aktivierten Gates analysiert. Bei der Gegenüberstellung von CD3 Antikörpern gegen CD4 Antikörper konnte die gewünschte Population der CD3+ und CD4+ Lymphozyten herausgesucht werden. Bei einigen Versuchen wurde in diesem Schritt durch Negativselektion die Population der CD14, CD19 und cell viability negativen identifiziert.





**Abbildung 2.8 Darstellung der Auswahl CD3+ und CD4+ Zellpopulationen**



**Abbildung 2.9 Darstellung der Auswahl der CD14, CD19 und Viability negativen Zellpopulationen**

Die darauffolgenden spezifischen Auswertungsschritte unterschieden sich bei den unterschiedlichen Experimenten und werden zugehörig zu den einzelnen Experimenten dort genauer präsentiert.

### 2.2.10 Statistik

Zur statistischen Auswertung der erhobenen Daten wurde das Programm GraphPad Prism 4.0 für Macintosh der Firma GraphPad Software, Inc. aus La Jolla, CA verwendet.

Die Software wurde ebenfalls zur graphischen Darstellung benutzt.

Bei den angegebenen Werten handelt es sich, wenn nicht anders bezeichnet, um Mediane. Als statistisch signifikant wurden p-Werte von  $p \leq 0,05$  angenommen.

Die Signifikanz zweier Gruppen wurde mit Hilfe des Wilcoxon-Mann-Whitney-Test überprüft.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Aktivierung von T-Lymphozyten nach *in vitro* Stimulation mit HCV Proteinen

##### 3.1.1 Expression von CD154 in T-Zellen als Antwort auf HCV Struktur- und Nichtstrukturproteine

CD154, auch CD40 Ligand genannt, ist ein Transmembranprotein, welches auf ausgereiften und aktivierten T-Zellen exprimiert wird. Durch Interaktion mit seinem Liganden CD40 auf Antigenpräsentierenden Zellen werden insbesondere dendritische Zellen aber auch B-Zellen aktiviert, wodurch die spezifische Immunantwort in Gang gesetzt wird.

Es konnte gezeigt werden, dass CD154 ein sehr spezifischer und früher Marker der T-Zellaktivierung ist und unabhängig von anderen T-Zellfunktionen wie beispielsweise Zytokinsekretion exprimiert wird. Damit erlaubt dieser Marker auch den Nachweis von funktionell gestörten T-Zellen.

Versuche mit einem zweiten T-Zell-Marker CD25 wurden ebenfalls durchgeführt, um die Aktivierung von T-Zellen genauer zu untersuchen. Es zeigte sich allerdings, dass der hier beschriebene CD154 Assay wesentlich spezifischer ist und daher für die Absicht dieser Arbeit geeigneter. Die Ergebnisse des CD25 Assays sind nachfolgend daher nicht dargestellt.

In diesem Versuch wurde die Expression von CD154 auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach 15-stündiger Stimulation mit den HCV Proteinen NS3, NS4, NS5 sowie dem Core Protein untersucht.

Die Proteine wurden in einer Konzentration von 3,5µg/ml AB-Medium zu den Zellen gegeben. Als Positivkontrolle wurden Tetanustoxin in einer Konzentration von 10µg/ml und Staphylokokkenenterotoxin B mit einer Konzentration von 2µg/ml verwendet.

Zur Identifizierung einer HCV spezifischen zellulären Immunaktivierung, die mit der Aktivierung von CD154 assoziiert ist, wurden PBMC von 13 HCV ausgeheilten, 10 chronischen HCV Patienten und 16 exponierten Personen auf ihre CD154 Expression getestet. Als Referenzgruppe wurden 10 gesunde Kontrollpersonen verwendet. Im Nachfolgenden wird das Aktivierungsmuster der einzelnen Probandengruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe dargestellt.

Bei den genannten Werten handelt es sich, wenn nicht anders beziffert, um Mediane. Eine statistische Signifikanz wurde ab einem p-Wert von  $p < 0,05$  angekommen.

Alle Werte sind durch Subtraktion der Reaktion auf das Kontrollmedium SOD „background“ korrigiert. Dadurch ist es erklärbar, dass positive und negative Werte zustande kamen. Das Zulassen der negativen Werte erlaubte eine korrektere statistische Auswertung.

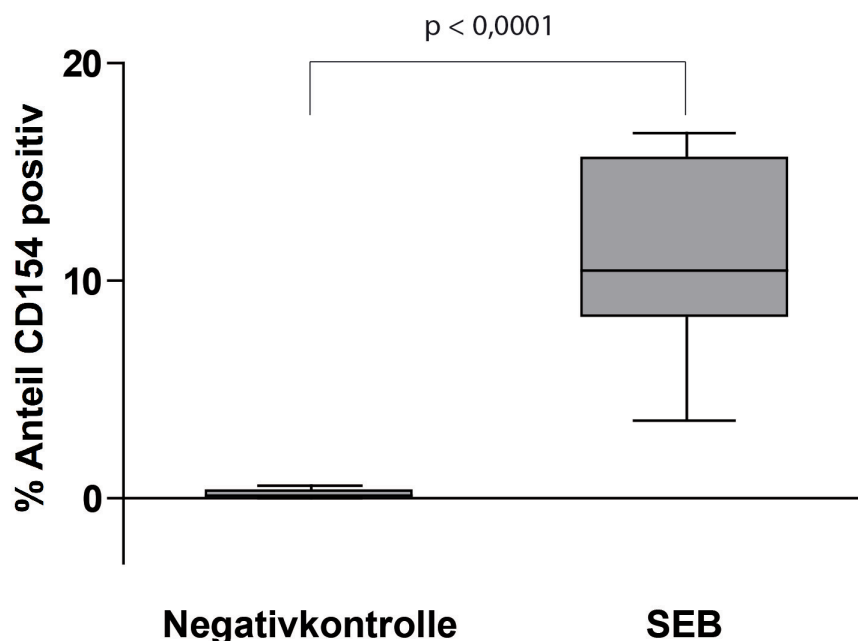
Zur Bestimmung der CD154+ CD4+ T Zellen wurde folgendermaßen vorgegangen:

Der Wert der prozentualen CD154 Aktivierung wurde ermittelt, indem nach „gaten“ auf die Population der CD3+ und CD4+ Zellen, der prozentuale Anteil der CD154+ Zellen an der Population der CD4+ Lymphozyten errechnet wurde.

Anhand einer Isotypkontrolle, konnte der Schwellenwert, ab welchem von CD154 Positivität ausgegangen wurde, festgelegt werden.

Als Positivkontrolle wurde Staphylokokkenenterotoxin B (SEB) verwendet. Zur Negativkontrolle wurde dem verwendeten AB-Medium Superoxiddismutase (SOD) beigelegt. Die verwendeten HCV Proteine sind aus herstellungstechnischen Gründen SOD-Fusionsproteine. Durch Subtraktion dieser Kontrolle konnten die Ergebnisse in Bezug auf Reaktionen gegen SOD korrigiert werden.

Nachfolgend dargestellt die Reaktion der 10 gesunden Kontrollpersonen auf die beiden Kontrollmedien:



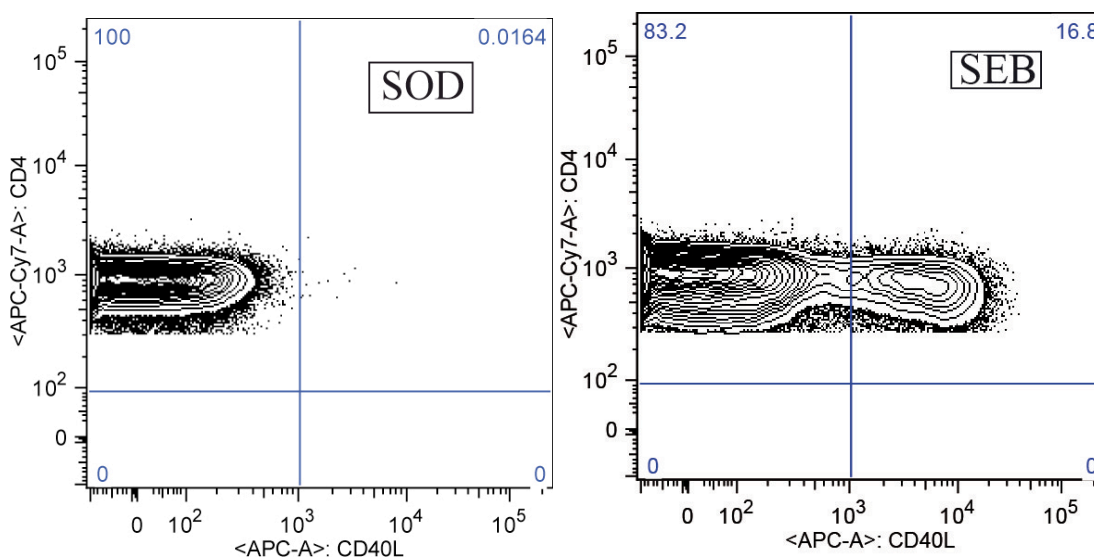
**Abbildung 3.1 Expression von CD154 nach 15-stündiger Stimulation mit den Kontrollmedien SOD und SEB. PBMC 10 gesunder Probanden wurden für 15 Stunden mit den Kontrollstimulantien Superoxiddismutase (SOD) sowie Staphylokokkenenterotoxin B (SEB) inkubiert. Mittels FACS Analyse**

wurde der prozentuale Anteil an CD154+ Zellen unter allen CD3+/CD4+ Lymphozyten ermittelt. P-Werte wurden mittels Mann-Whitney-U-Test errechnet. Ab einem  $p < 0,05$  wurde von statistischer Signifikanz ausgegangen. Der p-Wert ist in der Graphik angegeben.

Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied der CD154 Expression nach Stimulation mit SEB im Vergleich zu SOD ( $p < 0,0001$ ).

Bei dem Ergebnis ist ersichtlich, dass auch die Negativkontrolle SOD zu einer geringen Aktivierung von CD154 führt. Dies hat zur Folge, dass durch die Subtraktion dieser Kontrolle zur „Background-Korrektur“ negative Werte im Ergebnis auf die Reaktion der HCV Proteine zustande kommen können.

Die deutlich positive Reaktion auf SEB im Vergleich zu der Negativkontrolle SOD ließ sich eindeutig bei allen untersuchten Proben in der Auswertung der FACS Daten bildlich darstellen.

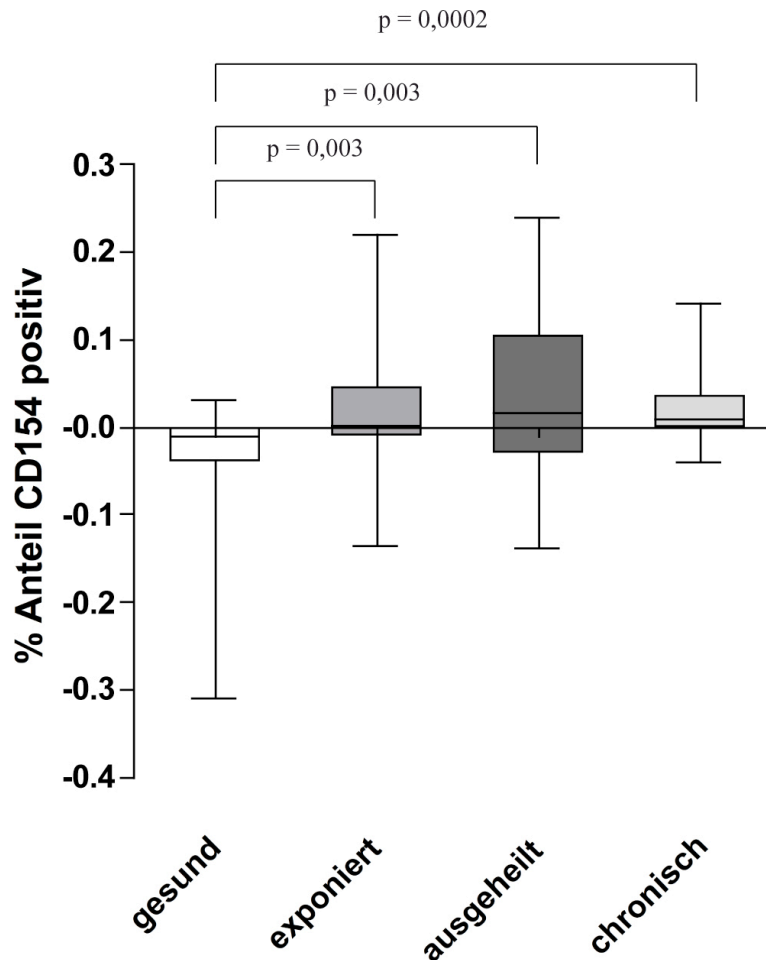


**Abbildung 3.2** Graphische Darstellung der FACS Auswertung. Die dargestellten Bilder wurden mit dem Programm FlowJo 8.8.6 der Firma Tree Star Inc. ausgearbeitet. Die in der Durchflusszytometrie gemessenen Daten wurden hiermit bearbeitet. Nach Auswahl des Lymphozytengates und nachfolgendem Gaten auf die Population der CD3+/CD4+ Zellen entstanden folgenden Bilder. Sie zeigen die Reaktion einer Normalperson auf 15-stündige Stimulation mit SOD sowie SEB. Die y-Achse bezieht die CD4+ Zellen die x-Achse zeigt CD154- beziehungsweise CD40L-Positivität. Der rechte obere Quadrant stellt die gesuchte Population der CD4+ und CD154+ Zellen dar und quantifiziert diese.

Zur näheren Untersuchung der Immunaktivierung auf HCV Proteine wurden diese in zwei Untergruppen geteilt. Einmal die Gruppe der Nichtstrukturproteine NS3, NS4 und NS5; auf

der anderen Seite das Strukturprotein Core. Die Aktivierung auf Nichtstrukturproteine NS3, NS4 und NS5 wurde als kumulativer Datensatz in die Analyse einbezogen.

Die folgende Graphik stellt die Ergebnisse in Form eines box-and-whiskers-Graphen dar.

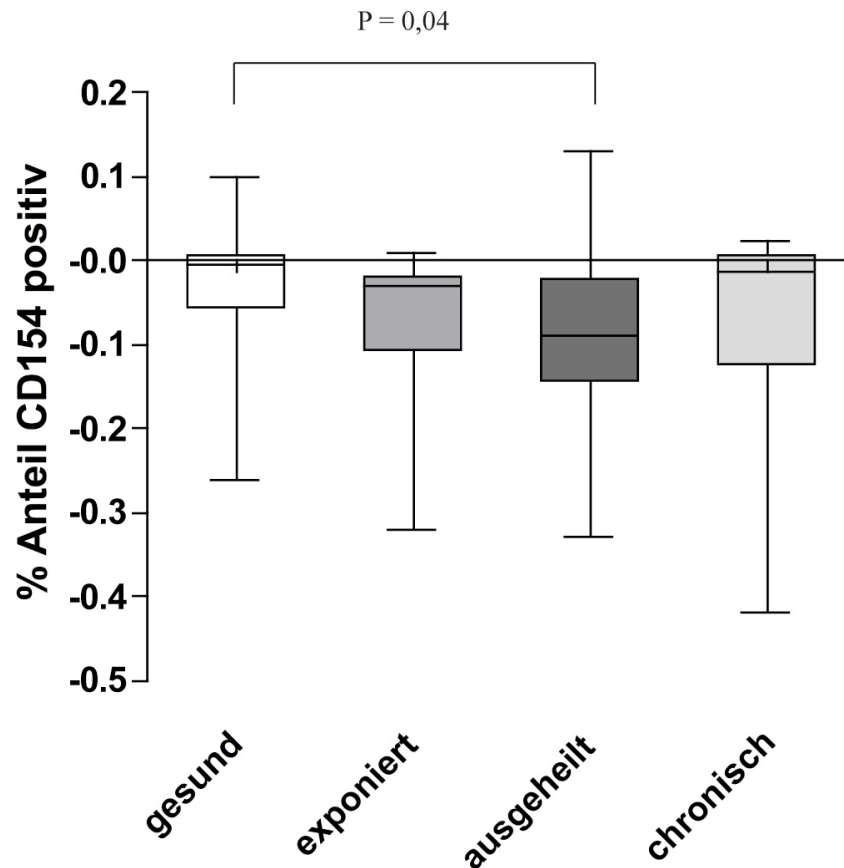


**Abbildung 3.3 Expression von CD154 nach Stimulation mit den HCV Proteinen NS3, NS4 und NS5.** Es wurden PBMC von gesunden Kontrollpersonen (n = 10), exponierten Probanden (n = 16), HCV ausgeheilten Probanden (n = 13) sowie HCV chronischen Probanden (n = 10) 15 Stunden mit den HCV Nichtstrukturproteinen NS3, NS4 und NS5 kultiviert. Mittels FACS Analyse wurde der prozentuale Anteil an CD154+ Zellen unter allen CD3+/CD4+ Lymphozyten ermittelt. Die Daten sind background korrigiert sowie als kumulativer Datensatz dargestellt. P-Werte wurden mittels Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Die Ergebnisse der Untersuchungsgruppen wurden mit der gesunden Kontrollgruppe verglichen, ein p-Wert von  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant erachtet. Alle drei Untersuchungsgruppen unterschieden sich statistisch signifikant von der gesunden Kontrollgruppe, p-Werte sind in der Graphik angegeben.

Es zeigte sich, dass sich alle drei Probandengruppen hinsichtlich der Zahl HCV-spezifischer CD154+CD4+ T Zellen signifikant von der gesunden Kontrollgruppe unterscheiden.

Nachfolgend wurde die Expression von CD154 als Reaktion auf die Stimulation mit dem HCV Strukturprotein Core untersucht.

Nachfolgend die graphische Darstellung in Form eines box-and-whiskers-Diagramms.



**Abbildung 3.4** Expression von CD154 nach Stimulation mit dem HCV Strukturprotein Core. Es wurden PBMC von gesunden Kontrollpersonen (n = 10), exponierten Probanden (n = 16), HCV ausgeheilten Probanden (n = 13) sowie HCV chronischen Probanden (n = 10) 15 Stunden mit dem HCV Strukturproteinen Core kultiviert. Mittels FACS Analyse wurde der prozentuale Anteil an CD154+ Zellen unter allen CD3+/CD4+ Lymphozyten ermittelt. Die Daten sind background korrigiert dargestellt. P-Werte wurden mittels Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Die Ergebnisse der Untersuchungsgruppen wurden mit der gesunden Kontrollgruppe verglichen, ein p-Wert von  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant erachtet. Lediglich die Gruppe der spontanen Ausheiler unterschied sich statistisch signifikant von den gesunden Kontrollpersonen, p-Wert ist in der Graphik angegeben.

Alleinig die ausgeheilte Probandengruppe zeigte formal einen signifikanten Unterschied, verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe, bei insgesamt sehr schwachen Core-spezifischen Reaktionen ist dies aber von fraglicher Bedeutung.

Die Gruppe der exponierten Probanden ( $p = 0,096$ ), sowie die Gruppe der chronischen HCV Patienten ( $p = 0,74$ ) zeigten keine statistische Signifikanz verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe.

Bei der bildlichen Auswertung der Daten mit dem Programm FlowJo 8.8.6 war ersichtlich, dass bei der Stimulation mit dem Core Protein bei fast allen Probanden der 4 Untersuchungsgruppen verglichen mit der Kontrolle SOD keine Immunaktivität nachweisbar war.

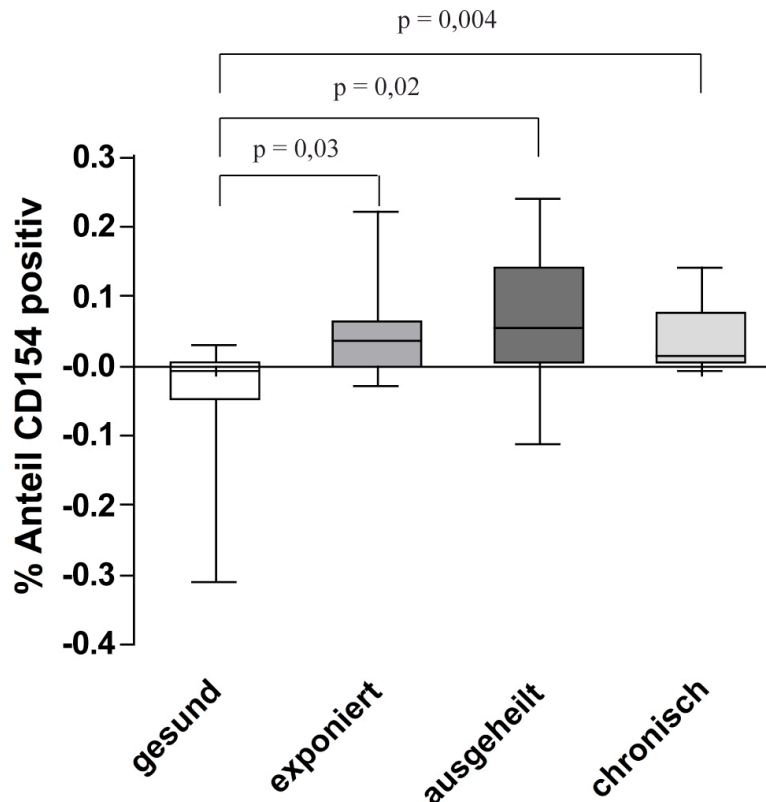
#### **3.1.1.1 Aktivierung von CD154 auf das HCV Nichtstrukturprotein NS3**

Um die Immunantwort der untersuchten Probandengruppen besser zu charakterisieren wurde die Aktivierung von CD154 nicht nur kumulativ untersucht, sondern zusätzlich jedes Protein auf seine Stimulation zur CD154 Expression einzeln analysiert.

Die Daten sind weiterhin background korrigiert dargestellt. P-Werte wurden mittels Mann-Whitney-U-Test untersucht.

Nachfolgendes Diagramm zeigt die Ergebnisse als box-and-whiskers-Graph.

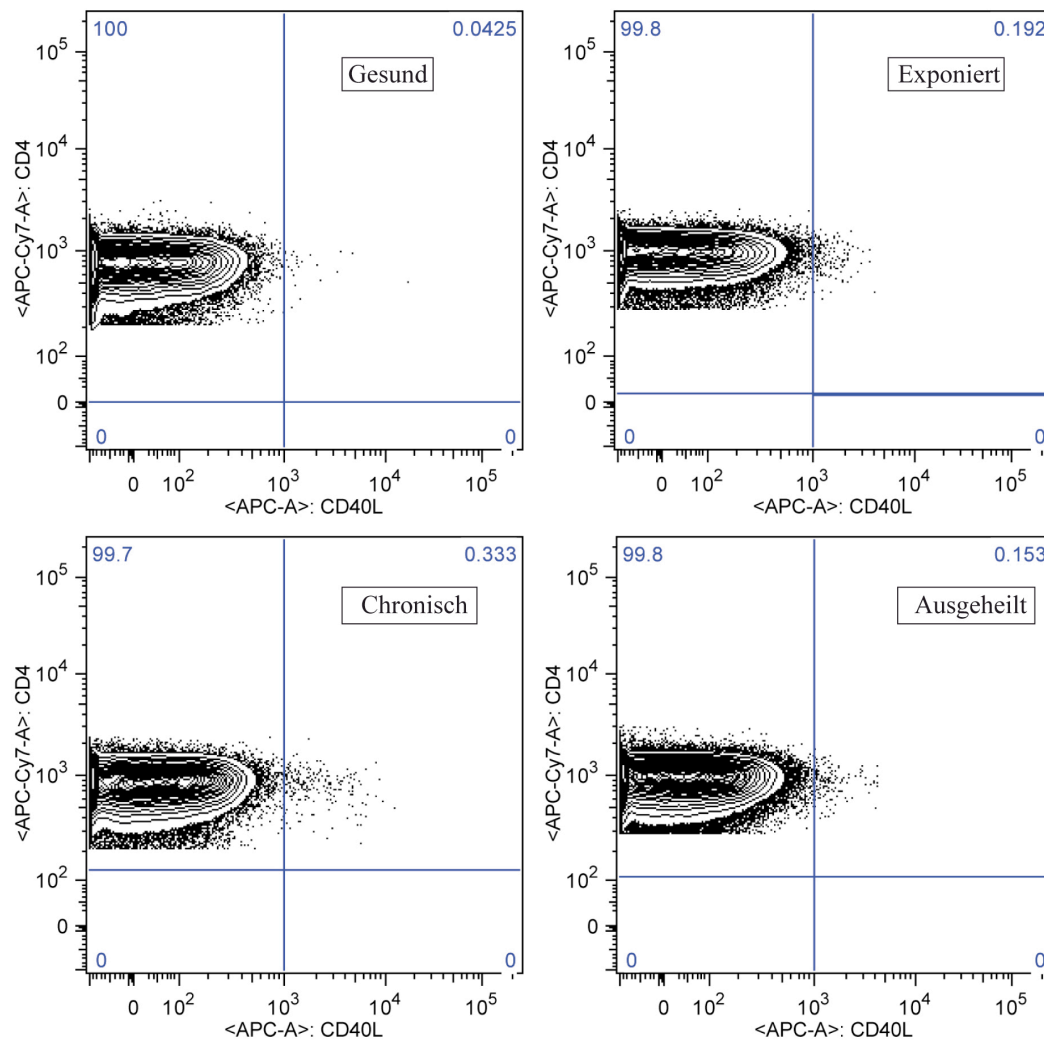




**Abbildung 3.5 Expression von CD154 nach Stimulation mit dem HCV Nichtstrukturprotein NS3.** Es wurden PBMC von gesunden Kontrollpersonen ( $n = 10$ ), exponierten Probanden ( $n = 16$ ), HCV ausgeheilten Probanden ( $n = 13$ ) sowie HCV chronischen Probanden ( $n = 10$ ) 15 Stunden mit den HCV Nichtstrukturproteinen NS3 kultiviert. Mittels FACS Analyse wurde der prozentuale Anteil an CD154+ Zellen unter allen CD3+/CD4+ Lymphozyten ermittelt. Die Daten sind background korrigiert dargestellt. P-Werte wurden mittels Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Die Ergebnisse der Untersuchungsgruppen wurden mit der gesunden Kontrollgruppe verglichen, ein p-Wert von  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant erachtet. P-Werte sind in der Graphik dargestellt.

Bei der Untersuchung der Aktivierung auf das Nichtstrukturprotein NS3 zeigte sich, dass alle 3 Untersuchungsgruppen eine signifikant höhere prozentuale CD154 Expression zeigten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe.

Die nachfolgenden Bilder zeigen die CD154 Expression bei Stimulation mit NS3 unterschiedlicher beispielhafter Probanden aus allen 4 Untersuchungsgruppen.



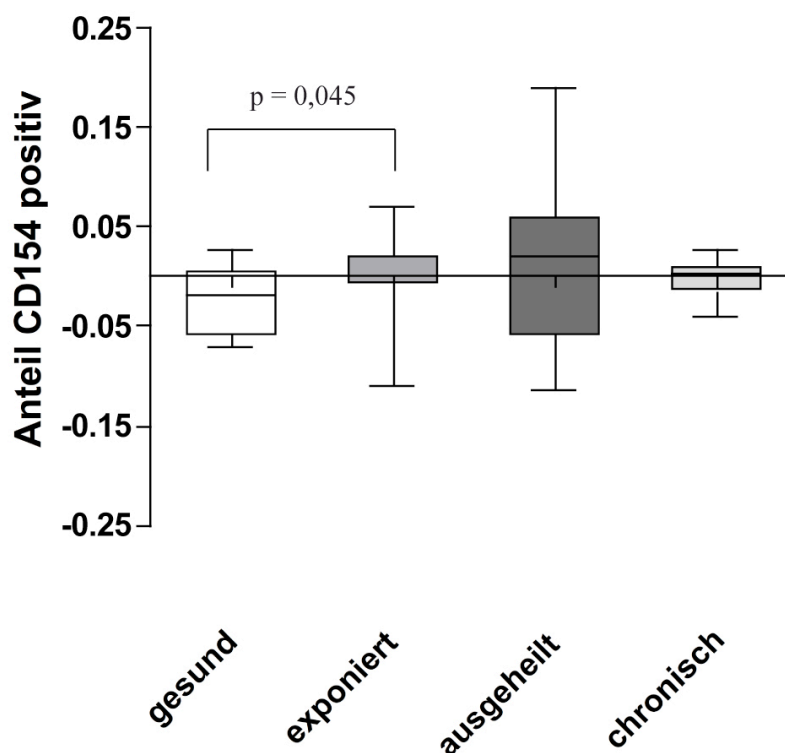
**Abbildung 3.6 Graphische Darstellung der FACS Auswertung.** Die dargestellten Bilder wurden mit dem Programm FlowJo 8.8.6 der Firma Tree Star Inc. ausgearbeitet. Die in der Durchflusszytometrie gemessenen Daten wurden hiermit bearbeitet. Nach Auswahl des Lymphozytengates und nachfolgendem Gaten auf die Population der CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Zellen entstanden folgenden Bilder. Sie zeigen die Reaktion der PBMC unterschiedlicher Probanden auf 15-stündige Stimulation mit NS3. Die Probanden stammen je aus der Untersuchungsgruppe der gesunden Probanden, der exponierten Probanden, der HCV chronischen Probanden sowie der HCV ausgeheilten Probanden; gelesen von links oben nach rechts unten. Die y-Achse bezieht die CD4<sup>+</sup> Zellen, die x-Achse zeigt CD154- beziehungsweise CD40L-Positivität. Der rechte obere Quadrant stellt die gesuchte Population der CD4<sup>+</sup> und CD154<sup>+</sup> Zellen dar und quantifiziert diese.

### 3.1.1.2 Aktivierung von CD154 auf das HCV Nichtstrukturprotein NS4

Des Weiteren wurde die Aktivierung von CD154 auf das HCV Nichtstrukturprotein NS4 untersucht.

Die Daten sind background korrigiert dargestellt. P-Werte wurden mittels Mann-Whitney-U-Test untersucht.

Nachfolgend sind die Ergebnisse graphisch in Form eines box-and-whiskers-Diagramm dargestellt.

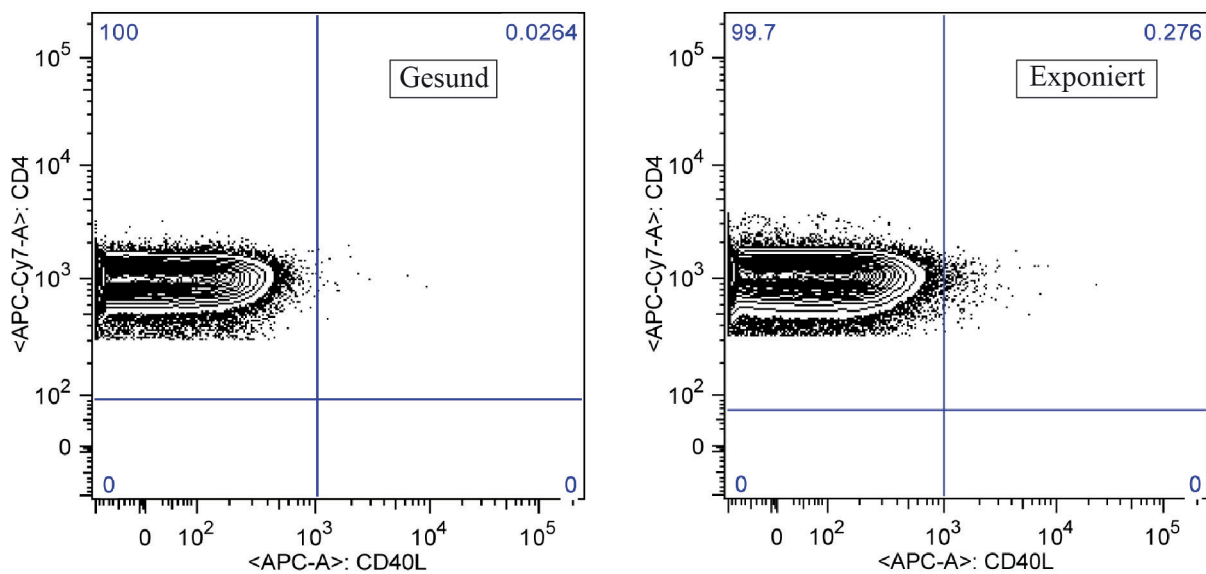


**Abbildung 3.7 Expression von CD154 nach Stimulation mit dem HCV Nichtstrukturprotein NS4.** Es wurden PBMC von gesunden Kontrollpersonen (n = 10), exponierten Probanden (n = 16), HCV ausgeheilten Probanden (n = 13) sowie HCV chronischen Probanden (n = 10) 15 Stunden mit den HCV Nichtstrukturproteinen NS4 kultiviert. Mittels FACS Analyse wurde der prozentuale Anteil an CD154+ Zellen unter allen CD3+/CD4+ Lymphozyten ermittelt. Die Daten sind background korrigiert dargestellt. P-Werte wurden mittels Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Die Ergebnisse der Untersuchungsgruppen wurden mit der gesunden Kontrollgruppe verglichen, ein p-Wert von  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant erachtet. Die exponierte Probandengruppe unterschied sich signifikant von der gesunden Kontrollgruppe mit einem P-Wert von  $p = 0,045$ .

Es zeigte sich bei der Analyse der errechneten Daten, dass lediglich die Gruppe der exponierten Probanden eine signifikant höhere Aktivierung von CD154 bei Stimulation mit

NS4 vergleichen mit der gesunden Kontrollgruppe zeigte ( $p = 0,045$ ). Die beiden anderen Probandengruppen unterschieden sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe (gesund – ausgeheilt  $p = 0,36$ ; gesund – chronisch  $p = 0,09$ ).

Nachfolgend die Bilder der CD154 Expression auf NS4 Stimulation zweier Probanden; das eines gesunden Probanden und das eines exponierten Probanden.



**Abbildung 3.8 Graphische Darstellung der FACS Auswertung.** Die dargestellten Bilder wurden mit dem Programm FlowJo 8.8.6 der Firma Tree Star Inc. ausgearbeitet. Die in der Durchflusszytometrie gemessenen Daten wurden hiermit bearbeitet. Nach Auswahl des Lymphozytengates und nachfolgendem Gaten auf die Population der CD3+/CD4+ Zellen entstanden folgenden Bilder. Sie zeigen die CD154 Aktivierung der PBMC eines gesunden (links) und eines exponierten (rechts) Probanden nach 15-stündiger Stimulation mit NS4. Die y-Achse bezieht die CD4+ Zellen die x-Achse zeigt CD154-beziehungsweise CD40L-Positivität. Der rechte obere Quadrant stellt die gesuchte Population der CD4+ und CD154+ Zellen dar und quantifiziert diese.

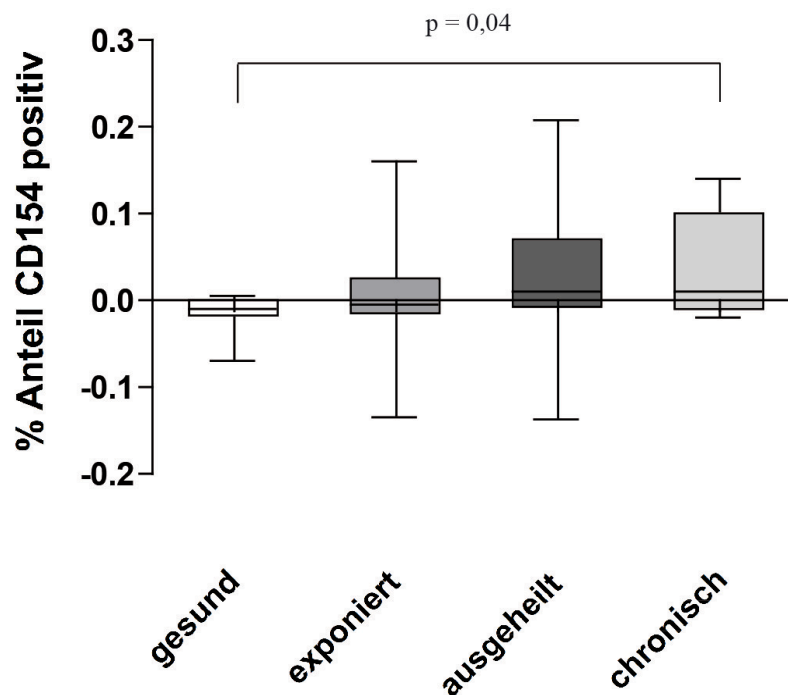
Diese FACS-Bilder (Abbildung 3.8) stellen exemplarisch den Unterschied in den Untersuchungsgruppen dar. In diesem Beispiel handelt es sich um eine circa 10-fach höhere CD154 Expression des exponierten Probanden im Vergleich zu einem gesunden Probanden.

### 3.1.1.3 Aktivierung von CD154 auf das HCV Nichtstrukturprotein NS5

Zuletzt wurde die CD154 Aktivierung auf das HCV Nichtstrukturprotein NS5 genauer analysiert.

Wie zuvor sind die Daten background korrigiert dargestellt. P-Werte wurden mittels Mann-Whitney-U-Test untersucht.

Die Ergebnisse sind als box-and-whiskers-Diagramm dargestellt.

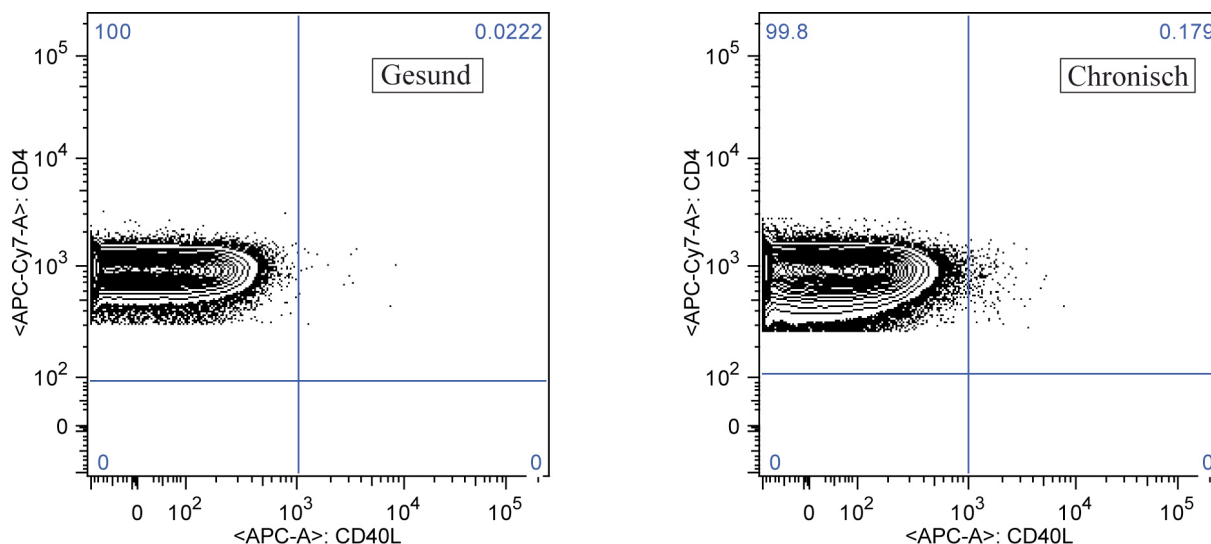


**Abbildung 3.9** Expression von CD154 nach Stimulation mit dem HCV Nichtstrukturprotein NS5. Es wurden PBMC von gesunden Kontrollpersonen ( $n = 10$ ), exponierten Probanden ( $n = 16$ ), HCV ausgeheilten Probanden ( $n = 13$ ) sowie HCV chronischen Probanden ( $n = 10$ ) 15 Stunden mit den HCV Nichtstrukturproteinen NS5 kultiviert. Mittels FACS Analyse wurde der prozentuale Anteil an CD154+ Zellen unter allen CD3+/CD4+ Lymphozyten ermittelt. Die Daten sind background korrigiert dargestellt. P-Werte wurden mittels Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Die Ergebnisse der Untersuchungsgruppen wurden mit der gesunden Kontrollgruppe verglichen, ein p-Wert von  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant erachtet. Die Probandengruppe der chronische HCV Patienten unterschied sich signifikant zur gesunden Kontrollgruppe mit einem p-Wert von  $p = 0,04$ .

Die Untersuchung zeigt, dass sich die Probandengruppe der chronischen Probanden als einzige signifikant von der gesunden Kontrollgruppe unterschied ( $p = 0,04$ ), bezüglich der Expression von CD154 bei Stimulation mit NS5. Die Gruppe der ausgeheilten ( $p = 0,09$ )

sowie die exponierte Gruppe ( $p = 0,46$ ) unterschieden sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe.

Hier die Gegenüberstellung der CD154 Stimulation einer gesunden Kontrollperson und eines chronischen HCV Patienten.



**Abbildung 3.10** Graphische Darstellung der FACS Auswertung. Die dargestellten Bilder wurden mit dem Programm FlowJo 8.8.6 der Firma Tree Star Inc. ausgearbeitet. Die in der Durchflusszytometrie gemessenen Daten wurden hiermit bearbeitet. Nach Auswahl des Lymphozytengates und nachfolgendem Gaten auf die Population der CD3+/CD4+ Zellen entstanden folgenden Bilder. Sie zeigen die CD154 Aktivierung der PBMC eines gesunden (links) und eines HCV chronischen (rechts) Probanden nach 15-stündiger Stimulation mit NS5. Die y-Achse beziffert die CD4+ Zellen; die x-Achse zeigt CD154-beziehungsweise CD40L-Positivität. Der rechte obere Quadrant stellt die gesuchte Population der CD4+ und CD154+ Zellen dar und quantifiziert diese.

#### **3.1.1.4 IFN $\gamma$ Sekretion der CD154+ Lymphozyten auf HCV Nichtstrukturproteine**

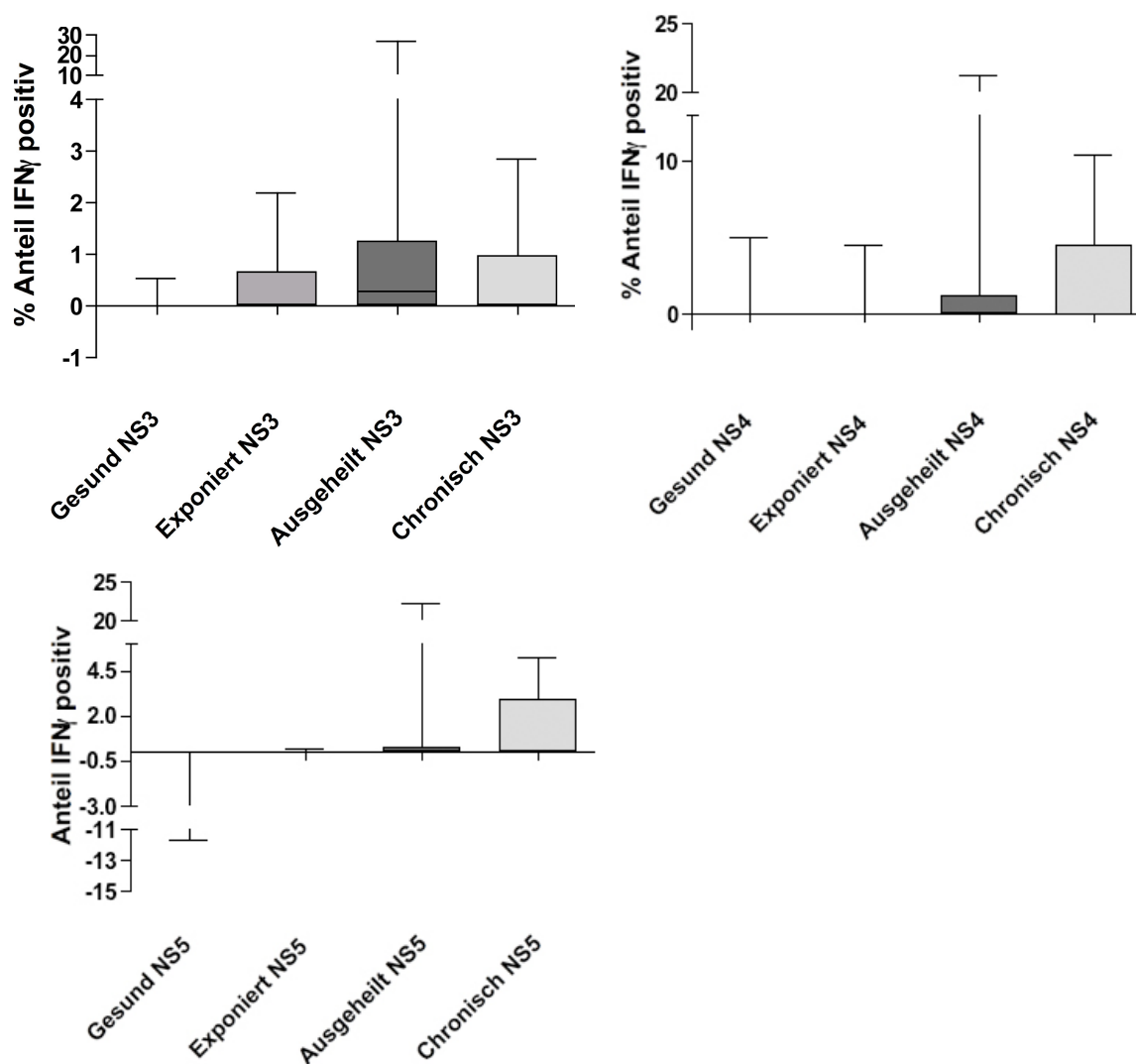
Um zusätzlich zu den Ergebnissen der CD154 Aktivierung als Immunantwort detaillierte Informationen über die Frequenzen der darüber hinaus zusätzlich IFN $\gamma$  produzierenden CD154+-Lymphozyten zu bekommen, wurde die sensitive Methode der intrazellulären Zytokinmessung mittels Durchflusszytometrie verwendet.

Hierfür wurde die Population der CD154+ T-Lymphozyten auf ihre Produktion von IFN $\gamma$  überprüft. Nach „gaten“ auf die CD4+/CD154+ Zellpopulation wurde der prozentuale Anteil an IFN $\gamma$  produzierenden Zellen unter allen CD154 exprimierenden Zellen ermittelt. Positive Werte wurden anhand der Positivkontrolle SEB festgelegt. Durch die Subtraktion der Reaktion auf die Negativkontrolle SOD wurden die Werte background korrigiert. Da eine berechnete negative Zytokin Sekretion praktisch nicht sinnvoll ist, wurden nach background Subtraktion negative Ergebnisse in der Auswertung gleich 0 gesetzt.

Es wurden die Ergebnisse von 8 gesunden Kontrollpersonen mit 16 exponierten Probanden, 12 ausgeheilten Probanden, sowie 10 chronischen Probanden verglichen.

Es konnte sich bei keinem der Nichtstrukturproteine NS3, NS4, NS5 ein signifikanter Unterschied in den Untersuchungsgruppen im Vergleich zu der gesunden Kontrollpopulation finden.

Hier die Ergebnisse in Form eines box-and-whiskers Diagramms.



**Abbildung 3.11** Produktion von IFN $\gamma$  durch CD154<sup>+</sup> Zellen nach Stimulation mit den HCV Nichtstrukturproteinen NS3, NS4 und NS5. Es wurden PBMC von gesunden Kontrollpersonen (n = 8), exponierten Probanden (n = 16), HCV ausgeheilten Probanden (n = 12) sowie HCV chronischen Probanden (n = 10) 15 Stunden mit den HCV Nichtstrukturproteinen NS3, NS4 und NS5 kultiviert. Mittels FACS Analyse wurde der prozentuale Anteil an CD154<sup>+</sup> Zellen unter allen CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Lymphozyten ermittelt. Anschließend wurden die CD154<sup>+</sup> Zellen mit positiver IFN $\gamma$  Produktion ermittelt. Die Daten sind background korrigiert dargestellt. P-Werte wurden mittels Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Die Ergebnisse der Untersuchungsgruppen wurden mit der gesunden Kontrollgruppe verglichen, ein p-Wert von  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant erachtet.

Durch die bereits starke Selektion, nur CD154<sup>+</sup>-Lymphozyten in die Analyse einfließen zu lassen und diese nachfolgend in IFN $\gamma$  positive und negative Populationen einzuteilen befassten wir uns hier mit extrem kleinen Zellpopulation, eventuell sogar nur mit einigen



wenigen einzelnen Zellen. Bei diesen kleinen Varianzen von nur wenigen Zellen war in der bildlichen Auswertung kein Trend einer Untersuchungsgruppe gegenüber der gesunden Kontrollgruppe erkennbar, was sich später auch in der statistischen Auswertung niederlegte.

### **3.2 Lymphozytäre Proliferation nach Stimulation mit HCV Proteinen**

Ein Hauptmerkmal des erworbenen Immunsystems ist die Fähigkeit von Antigen spezifischen Lymphozyten bei Kontakt mit einem Antigen schnell zu proliferieren und zu differenzieren.

Die Fähigkeit der Proliferation wurde daher in nachfolgendem Versuch untersucht.

Hierfür wurde die von Lyons et al. zuerst beschriebene Methode, mittels CFSE und Durchflusszytometrie die Zellteilung von Lymphozyten zu quantifizieren, verwendet.

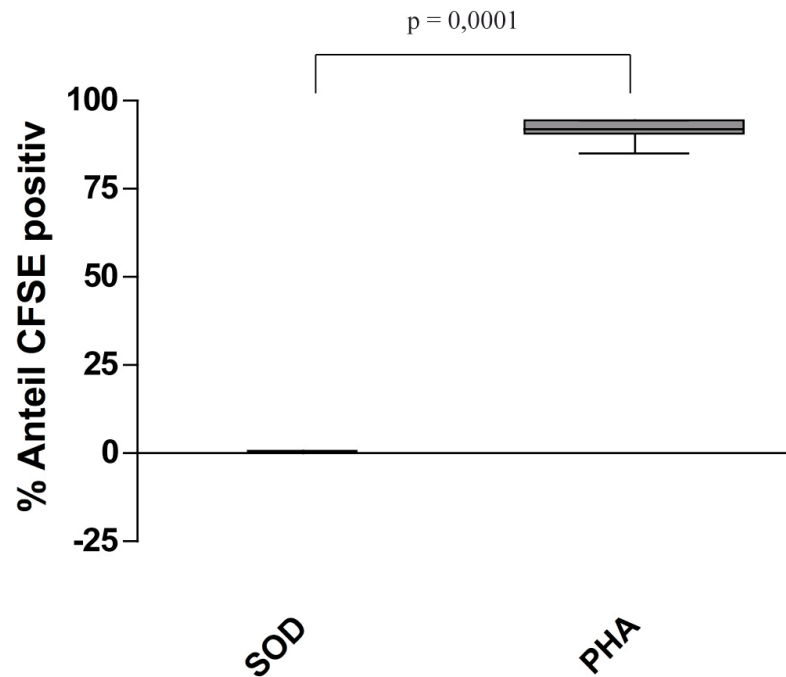
Es wurden PBMC von 9 gesunden Kontrollpersonen, 13 exponierten Probanden, 8 ausgeheilten Probanden und 6 chronischen HCV Probanden verwendet. Die PBMC wurden mit CFSE markiert und anschließend mit den HCV Proteinen NS3, NS4, NS5 und Core in einer Menge von je 7µg für 5 Tage bei 37°C inkubiert.

Es handelt sich bei den genannten Werten um den prozentualen Anteil CFSE+ und CD4+ Zellen an allen CD4+ Zellen. Die Werte sind background korrigiert und stellen Mediane dar. Durch die background Korrektur sind rechnerisch negative Werte möglich.

Statistische Signifikanz wurde mittels Mann-Whitney-U-Test bestimmt. Ab einem P-Wert von  $p < 0,05$  wurden von statistischer Signifikanz ausgegangen.

Als Kontrollen wurde Phytohämagglutinin (PHA) als Positivkontrolle und Superoxiddismutase (SOD) als Negativkontrolle verwendet.

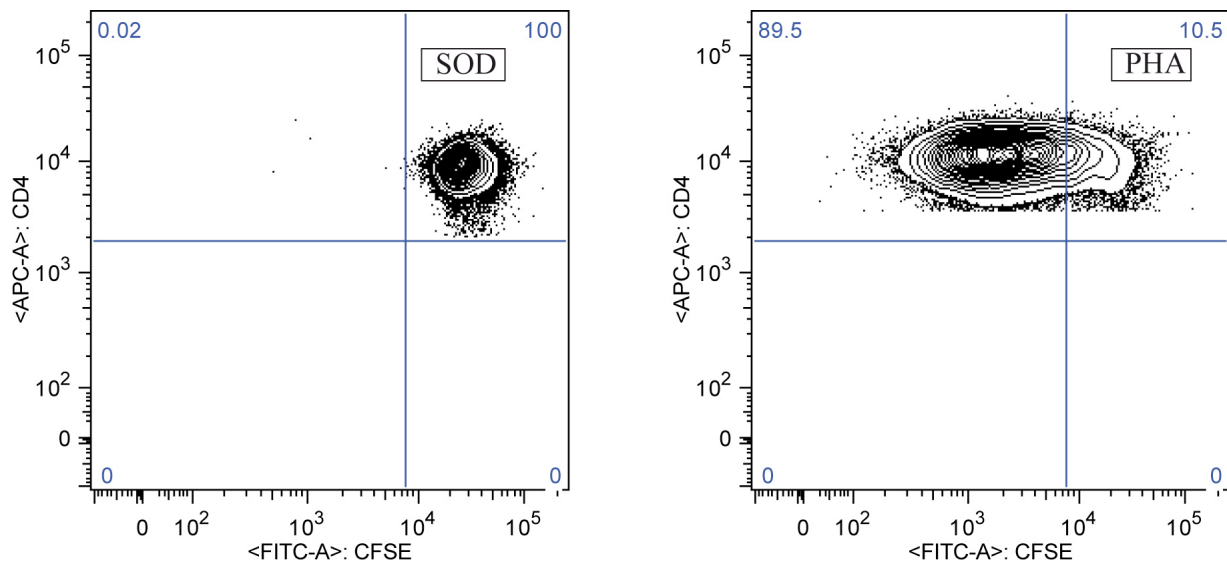
Um die Fähigkeit des Assays, proliferierte Zellen zu identifizieren, überprüfen zu können wurde zuerst die Proliferation auf die beiden Kontrollmedien quantifiziert.



**Abbildung 3.12 Proliferation von Lymphozyten nach 5-tägiger Stimulation mit den beiden Kontrollen Phytohämagglutinin (PHA) sowie Superoxiddismutase (SOD). PBMC 9 gesunder Kontrollpersonen wurden mit 7 µg SOD bzw. 20µg PHA stimuliert, mit CFSE gefärbt und für 5 Tage bei 37°C inkubiert. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Menge an CFSE nach Inkubation ermittelt. Durch gaten auf die Population der CD4+ Lymphozyten, konnte der prozentuale Anteil CFSE+ Zellen an allen CD4+ Lymphozyten errechnet werden. Statistische Signifikanz wurde mittels Mann-Whitney-U-Test festgestellt. Bei einem p-Wert von  $p < 0,05$  wurde von statistischer Signifikanz ausgegangen, dieser liegt im Vergleich PHA und SOD bei  $p = 0,0001$ .**

Beim Vergleich der beiden Kontrollen PHA und SOD in der Kontrollgruppe der 9 gesunden, zeigte sich eine deutlich höhere Proliferation bei Stimulation mit PHA. Es lag eine statistische Signifikanz mit  $p = 0,0001$  vor.

Die hohe statistische Signifikanz der Proliferationsfähigkeit bei Stimulation mit SOD beziehungsweise PHA ist sehr gut in den FACS Bildern der FlowJo Software zu sehen. Hier nachfolgend dargestellt der Vergleich der Proliferation PBMC einer gesunden Kontrollperson bei Stimulation mit SOD respektive PHA.



**Abbildung 3.13** Graphische Darstellung der FACS Auswertung. Die dargestellten Bilder wurden mit dem Programm FlowJo 8.8.6 der Firma Tree Star Inc. ausgearbeitet. Die in der Durchflusszytometrie gemessenen Daten wurden hiermit bearbeitet. PBMC einer gesunden Kontrollperson wurden für 5 Tage in SOD beziehungsweise PHA versetztem Medium stimuliert. Nach durchflusszytometrischer Messung folgte die dargestellte Auswertung. Nach Auswahl des Lymphozytengates und nachfolgendem Gaten auf die Population der CD4+ Zellen entstanden folgenden Bilder. Sie zeigen die proliferierten T-Lymphozyten gemessen an ihrer CFSE Konzentration. Verglichen wird die Proliferation auf Stimulation mit SOD (links) sowie PHA (rechts). Die y-Achse bezieht die CD4+ Zellen, die x-Achse zeigt die von rechts nach links abnehmende CFSE-Konzentration. Der linke obere Quadrant stellt somit die gesuchte Population der sich proliferierten und damit CD4+ und CFSE+ Zellen dar und quantifiziert diese.

Die Proliferation von Lymphozyten auf die HCV Nichtstrukturproteine NS3, NS4 und NS5 wurde zu einem kumulativen Datensatz zusammengefasst. Die Proliferation auf das Strukturprotein Core wurde gesondert ausgewertet und wird weiter unten im Text behandelt.

Nachfolgende Graphik zeigt die Ergebnisse in Form eines box-and-whiskers-plot.

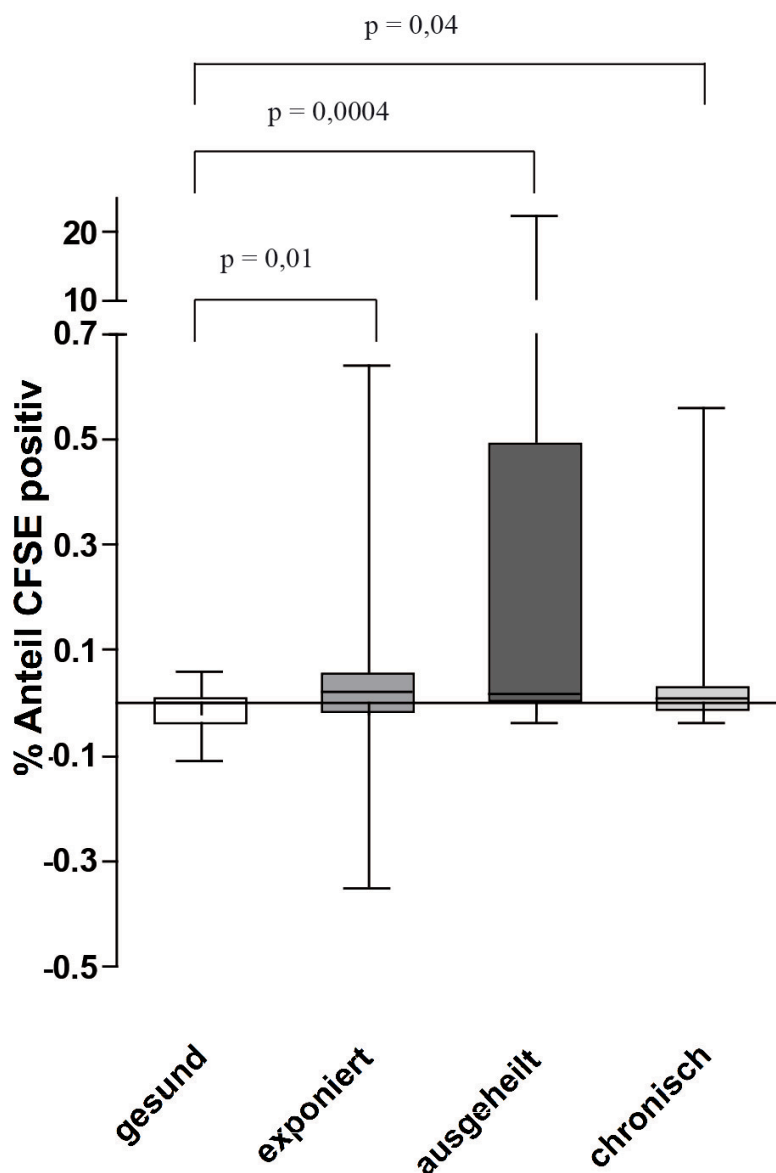
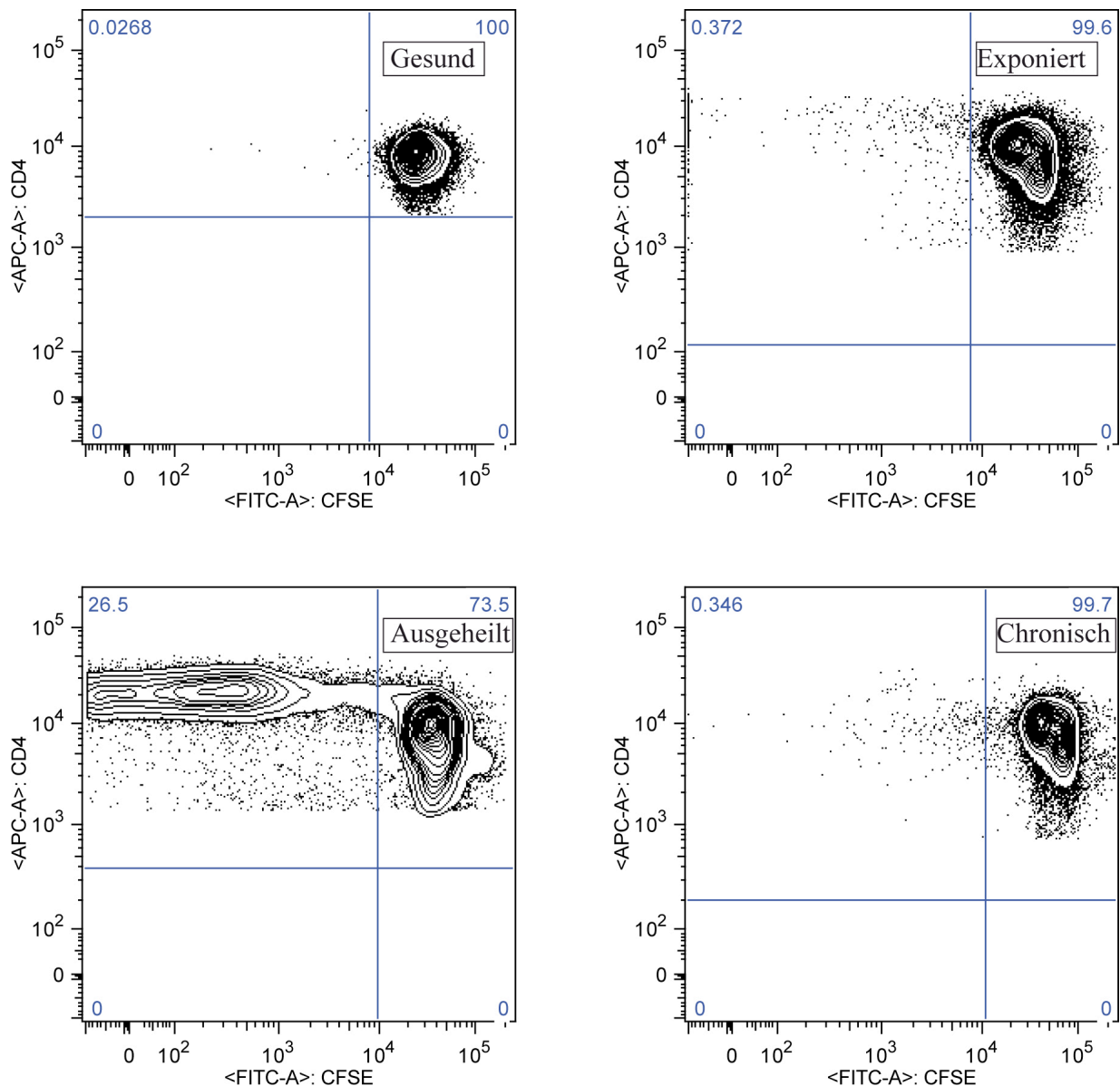


Abbildung 3.14 Proliferation von Lymphozyten nach Stimulation mit den HCV Nichtstrukturproteinen NS3, NS4 und NS5. PBMC 9 gesunder Kontrollpersonen, 13 exponierter Probanden, 8 ausgeheilter Probanden sowie 6 chronischer Probanden wurden mit CFSE gefärbt und mit je 7µg NS3, NS4 bzw. NS5 für 5 Tage bei 37°C inkubiert. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Menge an CFSE nach Inkubation ermittelt. Durch gaten auf die Population der CD4+ Lymphozyten, konnte der prozentuale Anteil CFSE+ Zellen an allen CD4+ Lymphozyten errechnet werden. Die Daten sind als kumulativer Datensatz der Proliferation auf NS3, NS4 und NS5 zusammengefasst und stellen Mediane dar. Die Werte wurden background korrigiert. Statistische Signifikanz wurde mittels Mann-Whitney-U-Test festgestellt. P-Werte von  $p < 0,05$  wurden als statistisch signifikant erachtet. P-Werte wurden in die Graphik eingetragen.

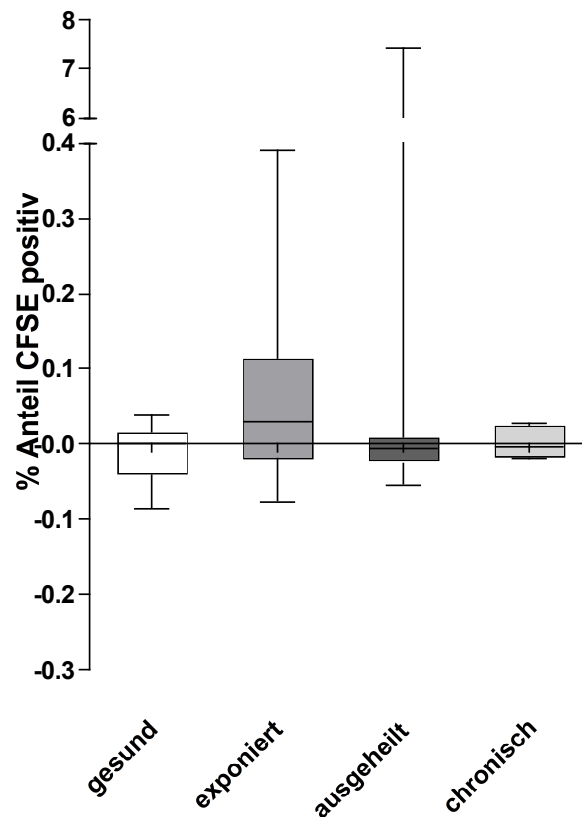


**Abbildung 3.15** Graphische Darstellung der FACS Auswertung. Die dargestellten Bilder wurden mit dem Programm FlowJo 8.8.6 der Firma Tree Star Inc. ausgearbeitet. Die in der Durchflusszytometrie gemessenen Daten wurden hiermit bearbeitet. PBMC der Probanden wurden für 5 Tage mit NS3 stimuliert. Nach durchflusszytometrischer Messung folgte die dargestellte Auswertung. Nach Auswahl des Lymphozytengates und nachfolgendem Gaten auf die Population der CD4<sup>+</sup> Zellen entstanden folgenden Bilder. Sie zeigen die proliferierten T-Lymphozyten, gemessen an ihrer CFSE Konzentration. Dargestellt ist die Proliferation einer beispielhaften gesunden Kontrollperson, eines exponierten, eines HCV ausgeheilten und eines chronischen HCV Probanden gelesen von links oben nach rechts unten. Die y-Achse bezieht die CD4<sup>+</sup> Zellen, die x-Achse zeigt die von rechts nach links abnehmende CFSE-Konzentration. Der linke obere Quadrant stellt somit die gesuchte Population der sich proliferierten und damit CD4<sup>+</sup> und CFSE<sup>+</sup> Zellen dar und quantifiziert diese.

Die präsentierten FACS Bilder verdeutlichen den signifikanten Unterschied der Proliferation aller 3 Untersuchungsgruppen verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe. Hierbei ist

besonders ersichtlich, dass die ausgeheilten Probanden hervorstechen und eine fulminante Proliferation auf in vitro Kontakt mit NS3 zeigen.

Des Weiteren wurde die Proliferation auf das HCV Strukturprotein Core untersucht. Die Ergebnisse sind graphisch in nachfolgendem box-and-whiskers-Diagramm dargestellt.



**Abbildung 3.16** Proliferation von Lymphozyten nach Stimulation mit dem HCV Strukturproteinen Core. PBMC 9 gesunder Kontrollpersonen, 13 exponierter Probanden, 8 ausgeheilter Probanden sowie 6 chronischer Probanden wurden mit CFSE gefärbt und mit je 7µg Core Protein für 5 Tage bei 37°C inkubiert. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Menge an CFSE nach Inkubation ermittelt. Durch gaten auf die Population der CD4+ Lymphozyten, konnte der prozentuale Anteil CFSE+ Zellen an allen CD4+ Lymphozyten errechnet werden. Die Daten stellen Mediane dar. Die Werte wurden background korrigiert. Statistische Signifikanz wurde mittels Mann-Whitney-U-Test festgestellt. P-Werte von  $p < 0,05$  wurden als statistisch signifikant erachtet.

Die Ergebnisse zeigen hier keinen signifikanten Unterschied der Proliferation aller drei Untersuchungsgruppen verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe. Der p-Wert lag bei der exponierten Probandengruppe bei  $p = 0,14$ , im Falle der HCV spontanen Ausheiler bei  $p = 0,54$  sowie bei  $p = 0,95$  in der Gruppe der chronischen HCV Patienten, jeweils im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe.

Die Mediane wurden berechnet mit einer Höhe von 0,001 bei der gesunden Kontrollgruppe, 0,03 bei den exponierten Probanden, -0,01 bei den spontanen HCV ausgeheilten sowie -0,003 bei den chronischen HCV Patienten.

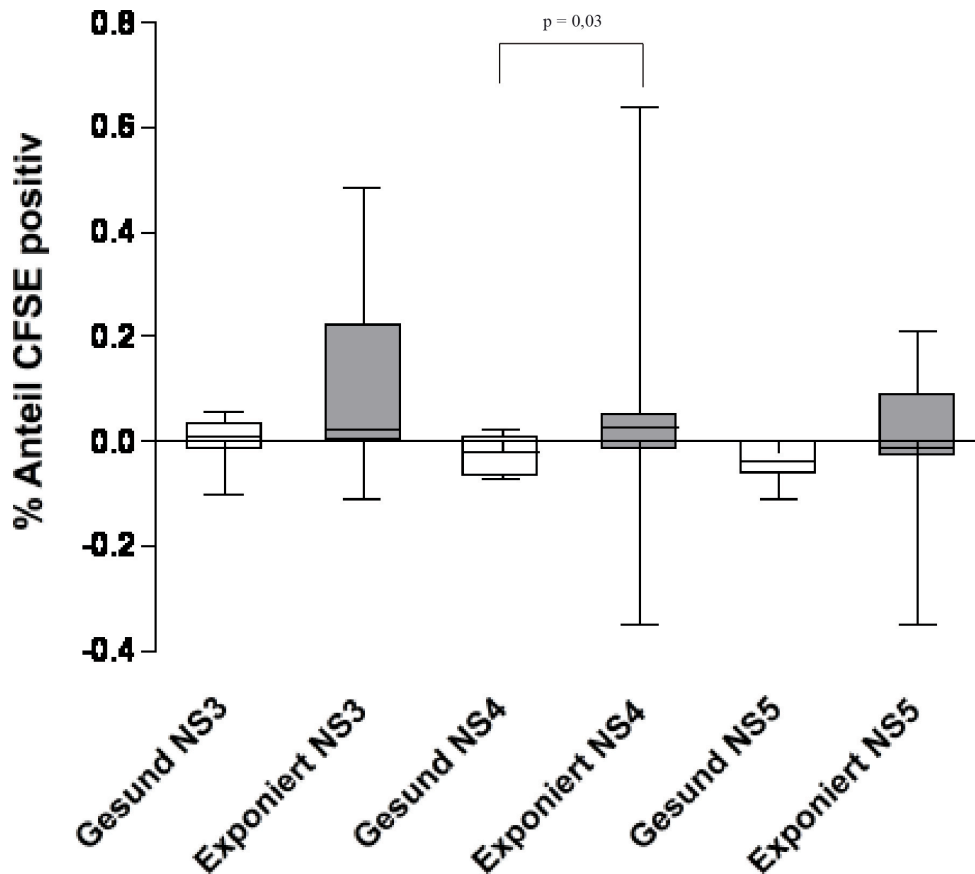
### **3.2.1 Vergleich der Nichtstrukturproteine NS3, NS4 sowie NS5 von gesunden und HCV exponierten Probanden**

Zur genaueren Untersuchung der Proliferationsfähigkeit PBMC exponierter Probanden ist es sinnvoll die Reaktion auf die einzelnen Nichtstrukturproteine NS3, NS4 und NS5 differenziert zu betrachten.

Dargestellt sind die gleichen 9 gesunden Kontrollpersonen verglichen mit den 13 exponierten Probanden, die in den kumulativen Datensatz eingeflossen sind.

Die Daten sind weiterhin background korreliert sowie als Mediane dargestellt. Statistische Signifikanz wurde ebenfalls mittels Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Ein p-Wert von  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant erachtet.

In der folgenden Graphik sind die Ergebnisse in Form eines box-and-whisker-plots dargestellt.



**Abbildung 3.17** Proliferation von Lymphozyten nach Stimulation mit den HCV Nichtstrukturproteinen NS3, NS4 und NS5. PBMC 9 gesunder Kontrollpersonen und 13 exponierter Probanden wurden mit CFSE gefärbt und mit je 7µg NS3, NS4 bzw. NS5 für 5 Tage bei 37°C inkubiert. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Menge an CFSE nach Inkubation ermittelt. Durch gaten auf die Population der CD4<sup>+</sup> Lymphozyten, konnte der prozentuale Anteil CFSE<sup>+</sup> Zellen an allen CD4<sup>+</sup> Lymphozyten errechnet werden. Die Daten stellen Mediane dar. Die Werte wurden background korrigiert. Statistische Signifikanz wurde mittels Mann-Whitney-U-Test festgestellt. P-Werte von  $p < 0,05$  wurden als statistisch signifikant erachtet. Der statistische Unterschied zwischen gesund NS4 und exponiert NS4 ist mit einem p-Wert von  $p = 0,03$  bewiesen.

Eine Statistische Signifikanz zeigte sich im Vergleich der Reaktion auf NS4 ( $p = 0,03$ ). Die beiden anderen Proteine NS3 ( $p = 0,32$ ) und NS5 ( $p = 0,16$ ) konnten keine Signifikanz zeigen.

Die statistische Auswertung verdeutlicht, dass sich die beiden Untersuchungsgruppen in Bezug auf ihre Proliferation bei Stimulation mit NS3 sowie NS5 nicht unterscheiden. Einzelne exponierte Probanden zeigen allerdings eine erhöhte Proliferation im Vergleich zum gros der gesunden Population siehe Abbildung 3.17, dies sind jedoch nur Ausnahmen, die sich im Median der Gruppe nicht widerspiegeln.



Dagegen ist der errechnete signifikante Unterschied der Proliferation auf NS4 in FACS Bildern nicht herausragend sichtbar.

### **3.3 Intrazellulärfärbung der Interferon- $\gamma$ Produktion nach 14-tägiger Zellkultur**

Nach Untersuchung der IFN $\gamma$  Produktion von aktivierten Lymphozyten in frischen PBMC nach 15-stündiger Inkubation mit HCV Proteinen stellte sich die Frage, ob durch eine längere Stimulation mit HCV Peptiden in einer Zellkultur die Fähigkeit zur IFN $\gamma$  Produktion angeregt werden könnte. Demnach wurde eine Zellkultur angelegt, bei der PBMC unterschiedlicher Untersuchungsgruppen zur Produktion von Interferon- $\gamma$  angeregt werden sollten.

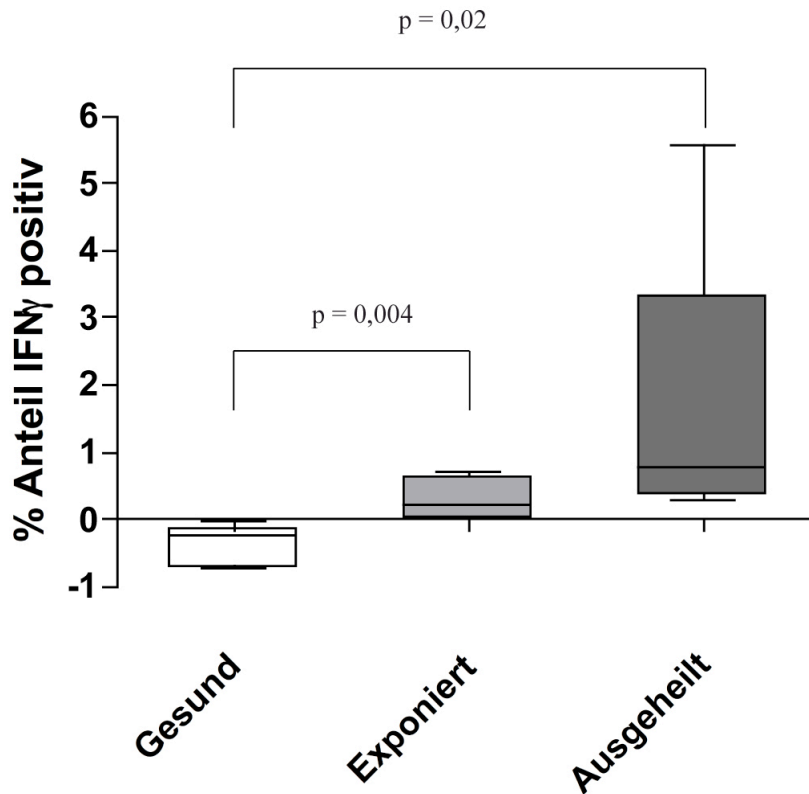
Es wurden PBMC 5 gesunder Kontrollpersonen, 6 HCV exponierter sowie 4 HCV ausgeheilter Probanden verwendet. Als Antigene dienten HCV Peptide aus dem NS3 bzw. NS4 Bereich, die HLA-gematched zum jeweiligen Probanden verwendet werden konnten.

Zur Darstellung der IFN $\gamma$  Antwort wurde zuletzt nach der Inkubationszeit eine Intrazellulärfärbung nach dem Protokoll von Lamoreaux et al. durchgeführt.

Bei den genannten Werten handelt es sich um Mediane. Die Daten sind alle durch die Subtraktion der Negativkontrolle background korrigiert und stellen den prozentualen Anteil an IFN- $\gamma$  positiven CD4 $^{+}$  Zellen an allen gemessenen CD4 $^{+}$  Lymphozyten dar.

Statistische Signifikanz wurde mittels Mann-Whitney-U-Test errechnet. Ein p-Wert von  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant gewertet.

Nachfolgende Graphik stellt die Werte als box-and-whiskers-Diagramm dar.

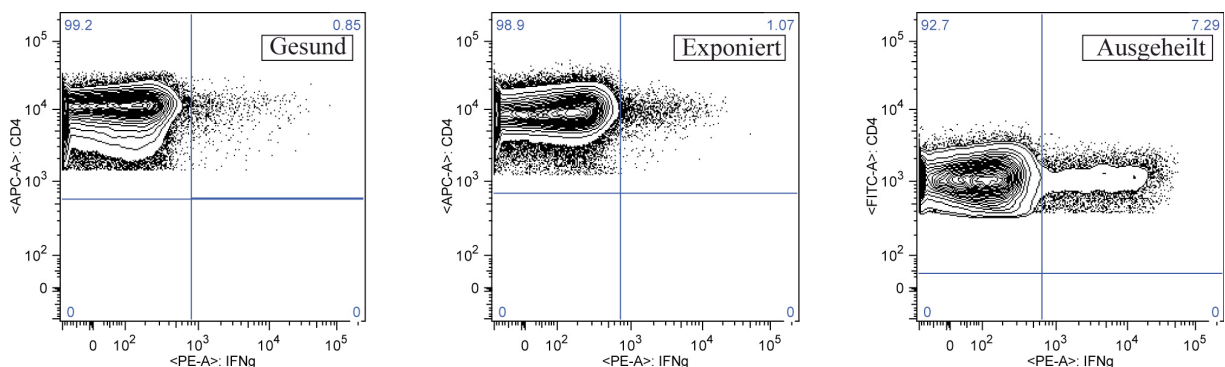


**Abbildung 3.18 IFN $\gamma$  Produktion nach 14-tägiger Stimulation mit HCV Peptiden.** PBMC von 5 gesunden Kontrollpersonen, 6 exponierten Probanden und 4 ausgeheilten Probanden wurden mit 10 $\mu$ g HCV Peptiden für 14 Tage bei 37°C inkubiert. HCV Peptide wurden HLA gematched verwendet. Probanden mit dem HLA DRB1\*0101/0102 wurden mit dem Peptid TLLFNILGGWVAA stimuliert, während Probanden mit dem HLA DRB1\*1501/1502 mit den Peptiden GINAVAYYRGLDVSV und NFPYLVAYQATVCARA stimuliert wurden. Die Peptide wurden in einer Menge von 10 $\mu$ g verwendet. An Tag 14 folgte eine Intrazellulärfärbung von IFN $\gamma$ , sodass die IFN $\gamma$  Produktion durchflusszytometrisch gemessen werden konnte. Die Auswertung ermittelte den prozentualen Anteil IFN $\gamma$  produzierender CD4+ Lymphozyten, an allen gemessenen CD4+ Zellen. Die Daten wurden background korrigiert und sind als Mediane der Untersuchungsgruppen dargestellt. Statistische Signifikanz wurde mittels Mann-Whitney-U-Test errechnet. Ein p-Wert von < 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen. Statistisch signifikante p-Werte sind in der Graphik dargestellt.

In der Untersuchung zeigte sich, dass beide Untersuchungsgruppen, also sowohl HCV exponierte Probanden ( $p = 0,004$ ) als auch HCV ausgeheilte Probanden ( $p = 0,02$ ), eine signifikant höhere IFN $\gamma$  Antwort zeigen verglichen mit den gesunden Kontrollpersonen.

Die ermittelten Mediane lagen in der gesunden Kontrollgruppe bei -0,23, in der Gruppe der exponierten bei 0,22, sowie bei 0,78 im Falle der HCV Spontanausheiler.

Die eindeutig höhere IFN $\gamma$  Produktion der HCV exponierten und HCV ausgeheilten Probanden zeigt sich auch in der Auswertung mit dem Programm FlowJo. Während sich bei den gesunden Kontrollpersonen die IFN $\gamma$  Produktion gleich groß beziehungsweise geringer darstellte verglichen mit der Reaktion auf die Negativkontrolle, konnte bei den beiden anderen Untersuchungsgruppen eine gesteigerte Zytokinproduktion auf HCV Peptide gefunden werden. In einem Beispiel sei dies hier verdeutlicht. Gezeigt wird jeweils ein Proband der drei Gruppen in seiner IFN $\gamma$  Expression.



**Abbildung 3.19 IFN $\gamma$ + CD4+ Lymphozyten nach 14-tägiger Stimulation mit HCV Peptiden.** Nach durchflusszytometrischer Messung wurden die Daten mit dem Programm FlowJo 8.3.3 der Firma Tree Star Inc. ausgewertet. Aus der Lymphozytenpopulation wurden CD3+/CD4+ Lymphozyten identifiziert und diese wie hier dargestellt auf ihre IFN $\gamma$  Positivität untersucht. Die y-Achse zeigt hierbei die CD4-Positivität, die x-Achse quantifiziert den Anteil IFN $\gamma$  positiver CD4+ Lymphozyten. Dieser lässt sich im rechten oberen Quadranten ablesen. Präsentiert ist die Reaktion einer gesunden Kontrollperson, eines exponierten Probanden sowie eines HCV ausgeheilten Probanden gelesen von links nach rechts.

### 3.4 HCV spezifische CD4+ T-Lymphozyten nach 14-tägiger Zellkultur mittels MHC-Klasse-II-Tetrameren

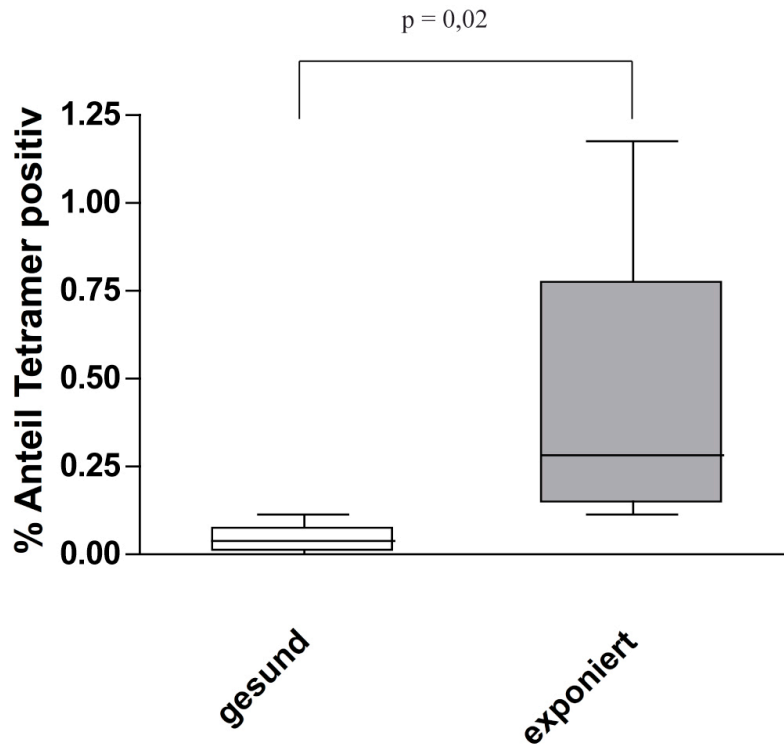
Zur Detektion HCV spezifischer T-Zellen nach 14-tägiger Stimulation mit HCV Peptiden wurde die Methode der MHC-II-Tetramerfärbung verwendet.

2 Millionen PBMC 5 gesunder Kontrollpersonen und 4 HCV exponierter Probanden wurden für 14 Tage in 1ml AB-Medium mit HCV Peptiden aus dem NS3 und NS4 Bereich stimuliert. Die HCV Peptide wurden HLA-gematched verwendet.

Bei den genannten Werten handelt es sich um background korrigierte Daten. Sie sind als prozentualer Anteil Tetramer positiver CD4+ Zellen unter allen CD4+ Zellen zu verstehen.

Statistische Signifikanz wurde mittels Mann-Whitney-U-Test errechnet. Ein p-Wert von  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant gewertet.

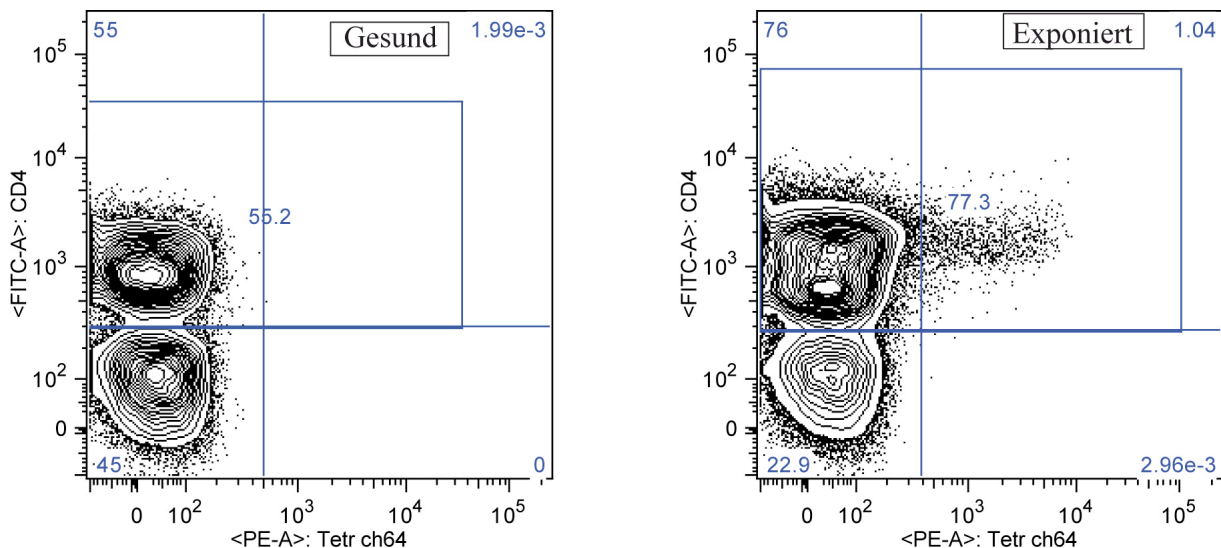
Nachfolgendes box-and-whiskers-Diagramm stellt die Daten graphisch dar.



**Abbildung 3.20** HCV spezifische Tetramer positive CD4<sup>+</sup> Zellen nach 14 tägiger Stimulation mit HCV Peptiden. 2 Millionen PBMC 5 gesunder Kontrollpersonen und 4 exponierter Probanden wurden in einer 14-tägigen Zellkultur mit HCV Peptiden stimuliert. Die HCV Peptide wurden HLA-gematched verwendet. Bei Probanden mit dem HLA Typ DRB1\*0101/0102 wurde das HCV Peptid mit der Aminosäuresequenz TLLFNILGGWVAA verwendet. Probanden mit dem HLA Typ DRB1\*1501/1502 wurden mit den passenden Peptiden mit den Aminosäuresequenzen GINAVAYYRGLDVSV sowie NFPYLVAYQATVCARA stimuliert. Die Peptide wurden in einer Menge von 10µg verwendet. Nach 14 Tagen erfolgte die Oberflächenfärbung sowie MHC-II-Tetramerfärbung zu Detektion der HCV Peptid spezifischen CD4<sup>+</sup> Zellen. Nach durchflusszytometrischer Analyse wurden die Daten ausgewertet. Zur Quantifizierung der MHC-II-Tetramer gebundenen und somit positiven Zellen wurde bei der Auswertung der Daten, der prozentuale Anteil an Tetramer positiven Zellen unter allen CD4<sup>+</sup> Lymphozyten ermittelt. Die Daten sind background korrigiert. Statistische Signifikanzen wurden mittels Mann-Whitney-U-Test ermittelt. P-Werte  $< 0,05$  wurden als statistisch signifikant erachtet.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Gruppe der exponierten Probanden im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant mehr Tetramer positive CD4<sup>+</sup> T-Zellen aufwies (0,28% vs. 0,04%,  $p = 0,02$ ).

Die deutlichen Unterschiede in der Expression Tetramer positiver und somit HCV Antigen positiver Lymphozyten zwischen den gesunden Kontrollen und HCV exponierten Probanden präsentieren sich in Bildern des Auswertungsprogramms FlowJo. Hierbei war bei allen gesunden Kontrollen eine verschwindend geringe Menge an Lymphozyten Tetramer positiv, während sich unter den exponierten durchaus Populationen von Tetramer positiven CD4<sup>+</sup> Lymphozyten zeigten. Exemplarisch sei hier ein Bild einer gesunden Kontrollperson sowie eines exponierten Probanden dargestellt.



**Abbildung 3.21** Graphische Darstellung der FACS Auswertung. Die dargestellten Bilder wurden mit dem Programm FlowJo 8.8.6 der Firma Tree Star Inc. ausgearbeitet. Die in der Durchflusszytometrie gemessenen Daten wurden hiermit bearbeitet. PBMC der Probanden wurden für 14 Tage mit HCV Peptiden stimuliert. Nach durchflusszytometrischer Messung folgte die dargestellte Auswertung. Nach Auswahl des Lymphozytengates und anschließendem Gaten auf die Population der CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Zellen entstanden folgenden Bilder. Sie verdeutlichen den prozentualen Anteil Tetramer positiver Zellen an den gemessenen CD4<sup>+</sup> Lymphozyten. Der rechte obere Quadrant stellt hier die gesunde Population CD4<sup>+</sup> Tetramer positiver Lymphozyten dar. Das linke Bild zeigt einen gesunden Probanden, das rechte Bild die Reaktion eines exponierten Probanden.

## 4 Diskussion

Die meisten Virusinfektionen des Menschen hinterlassen im Falle einer erfolgreichen Ausheilung eine protektive Immunität, die gegen eine Neuinfektion schützt. Dieses Dogma wurde bei der Hepatitis C Virusinfektion in Frage gestellt als man zeigen konnte, dass im einzigen Tiermodell der Hepatitis C, dem Schimpansen, nach ausgeheilter Infektion die Tiere sehr wohl erneut mit Hepatitis C Viren infiziert werden konnten. Letztlich ist aber der Nachweis einer protektiven Immunität die Voraussetzung für die Entwicklung eines Impfstoffs und für immuntherapeutische Ansätze.

Weitere Untersuchungen an Schimpansen mit durchgemachter Hepatitis C oder nach Impfung mit verschiedenen rekombinanten HCV Oberflächenproteinen konnten zeigen, dass zumindest eine relative Immunität induziert werden kann, die jedoch Subtyp-spezifisch ist und bereits bei einer Exposition mit anderen HCV Subtypen oder gar verschiedenen Genotypen eine Virämie nicht verhindern kann. Dosis-abhängig ist aber sogar eine Infektion mit dem gleichen Isolat möglich, so dass offensichtlich weder die durchgemachte Infektion noch die bisher getesteten Impfstoffkandidaten eine sterilisierende Immunität induzieren können [82] [83] [84] [85]. Dass selbst die Reinfektion mit dem homologen Genotypen nicht sicher vor einer erneuten Infektion mit dem HCV zu schützen scheint, beschreiben Bukh et al. in ihrer Arbeit [86]. Andere Arbeiten hierzu konnten durchaus eine protektive Immunität bei Schimpansen zeigen, die mit homologen sowie heterologen Genotypen des Hepatitis-C-Virus reinfiziert wurden und das Virus nochmals erfolgreich eliminieren konnten [87] [85]. Diese Datenlage ist zwar sehr kontrovers, zeigt allerdings, dass man keinesfalls davon ausgehen kann, dass eine durchgemachte HCV Infektion uneingeschränkt vor erneuter Infektion schützt beziehungsweise eine Inokulation von Virusmaterial eine protektive Immunität induzieren muss.

Entsprechende Untersuchungen am Menschen sind nur im Rahmen von retrospektiven Analysen und Kohortenstudien möglich. Bei Drogenabhängigen konnte gezeigt werden, dass eine erfolgreich durchgemachte HCV Infektion das Risiko einer erneuten, chronisch verlaufenden HCV Infektion um etwa 50% senken kann. [88] [89].

Es ist dadurch aber bestätigt, dass auch beim Menschen durch eine selbstlimitiert verlaufende HCV Infektion keine sterilisierende Immunität induziert wird. Es war insbesondere interessant, dass sogar eine erfolgreich ausgeheilte Infektion bei Reexposition einen chronischen Verlauf der Neuinfektion nicht verlässlich verhindern kann. Limitierend an diesen Beobachtungsstudien ist allerdings, dass meist der Genotyp der zurückliegenden

Infektion nicht bekannt war und so keine Aussage gemacht werden kann, inwieweit beispielsweise eine Infektion mit einem anderen Genotyp für den klinischen Verlauf verantwortlich war.

Was ist nun das Korrelat einer HCV-spezifischen Immunität? Die detailliertesten Untersuchungen hierzu stammen von Patienten mit akuter Hepatitis C, wobei Patienten mit selbstlimitiertem Verlauf mit solchen mit chronischem Verlauf verglichen werden können. Auch wenn die Frage einer nachhaltigen Immunität offen bleibt lässt sich an diesen Patienten zumindest klären, welche Immunreaktion erforderlich ist, um in der akuten Phase der Infektion eine Viruselimination zu erreichen. In zahlreichen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine starke und anhaltende virusspezifische Th1 Antwort mit der Ausheilung korreliert. [96] [49] [98]. Dementsprechend zeigt ein Zytokinmuster mit Th1 spezifischen Zytokinen wie IFN $\gamma$  und IL-2 eine bessere Chance auf langanhaltende Kontrolle des Virus [44] [96] [50].

Bezüglich der CD8<sup>+</sup> T Zellantwort fand sich bei ausheilenden Patienten eine multispezifische Immunantwort. Hier spielen Mutationen und bereits vorbestehende Sequenzvariationen eine große Rolle. Die Antikörperantwort insbesondere gegen die Oberflächenproteine des HCV ist potentiell virusneutralisierend, allerdings befinden sich die wichtigen Bindungsstellen in so genannten hochvariablen Virusabschnitten, so dass das HCV der Immunantwort rasch ausweichen kann. Damit trägt die humorale Immunantwort sicher zum Selektionsdruck auf der Viruspopulation bei. Es scheint aber mehr als bei anderen Virusinfektionen von der starken T-Zellantwort abzuhängen, ob die Erkrankung ausheilen kann [49] [98]. Ein progressives Verschwinden von HCV spezifischen T-Lymphozyten im Blut ist demnach mit einem erhöhten Risiko für chronische Erkrankung verbunden [97].

Eine andere Population von Individuen, welche ein Modell für eine protektive Immunität darstellen könnten, sind Personen, die vermutlich multipel mit HCV exponiert wurden, bisher aber keine Erkrankung entwickelt haben und auch keine Serokonversion durchgemacht haben. Hierzu liegen mehrere Untersuchungen an exponiertem medizinischen Personal, an Sexualpartnern von chronisch infizierten Patienten und an i.v.-Drogenabhängigen vor. Untersuchungen zur zellulären Immunantwort konnten bei einem hohen Anteil dieser Individuen HCV-spezifische Immunreaktionen nachweisen, was für einen echten Kontakt mit dem Virus spricht.

Mehrere Studien über i.v. Drogenabhängige beschreiben die Tatsache, dass es bei einzelnen Individuen trotz jahrelangem riskanten Nadelteilens mit HCV infizierten Personen zu keiner Infektion gekommen ist [81] [90] [91] [92]. Kubitschke et al. beschreiben 10 Fälle von

medizinischem Personal, bei denen Nadelstichverletzungen mit infizierten Nadeln weder zu einer Infektion noch zu Serokonversion führten [93]. Der Umstand, dass Personen im Haushalt von chronischen Hepatitis C Patienten jahrelang uninfiziert bleiben ist ebenfalls mehrmals beschrieben worden [94] [64] [80] [65]. Mehrere Arbeiten mit dem Kollektiv von HCV-exponierten und nicht infizierten Personen konnten in *in vitro* Versuchen nach Stimulation mit HCV Struktur- und Nichtstrukturproteinen HCV spezifische T-Zellantworten detektieren [64] [94]. In einer Studie von Bronowicki et al. konnte belegt werden, dass 20% der untersuchten exponierten, jedoch seronegativen Ehepartnern von HCV Patienten lymphozytäre Proliferation auf Peptide des NS3-Protein aufzeigen [94]. Auch Koziel et al. konnten bei einigen ihrer exponierten Probanden sowohl eine Antwort zytotoxischer T-Lymphozyten als auch Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf HCV Epitope finden [80]. In einzelnen Fällen scheint die T-Zellantwort von seronegativen exponierten Personen in Stärke und Umfang durchaus mit der CD4<sup>+</sup> sowie CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort von akut Erkrankten mit spontaner HCV Ausheilung vergleichbar zu sein [65].

Auch Studien mit i.v. drogenabhängigen Probanden, die durch riskantes Nadelteilen dem HCV Infektionsrisiko ausgesetzt sind kommen zu einem ähnlichen Ergebnis. In einem Kollektiv von i.v.-Drogenabhängigen, die durch gemeinsames Benutzen von Injektionsbesteck wiederholt mit HCV in Kontakt kamen, konnte eine hohe Prävalenz an HCV spezifischer IFN $\gamma$  Produktion im ELISPOT entdeckt werden [99]. Auch andere Studien mit diesem Kollektiv konnten IFN $\gamma$  Produktion sowie Zellzytotoxizität gegen HCV Struktur- und Nichtstrukturproteine entdecken [92] [100].

Die bisher erbrachte Datenlage zeigt, dass es bei exponierten Personen zu einer messbaren HCV spezifischen Immunantwort kommen kann bei *in vitro* Kontakt mit HCV-Antigenen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue immunologische Techniken einzusetzen, um die HCV-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort bei exponierten gesunden Individuen sowohl quantitativ als auch qualitativ genauer zu charakterisieren. Der CD40L-Assay ermöglicht die Detektion von virusspezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen unabhängig von deren funktionellen Eigenschaften, d.h. Zytokinsekretion oder Proliferation. Durch seine Unabhängigkeit vom HLA-Hintergrund im Gegensatz zur Tetramer-Technologie lässt sich dieser Assay bei allen Patienten anwenden. Die starke Selektion der CD40L positiven Zellen erschwert allerdings die nachfolgende Untersuchung auf Zytokinsekretion. Färbungen mit HLA Klasse II Tetrameren erlauben die direkte Markierung von Peptid-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen und eine gleichzeitige umfangreiche Phänotypisierung. Mit der Tetramer-Färbung lassen sich



spezifische Zellen bis zu einer Frequenz von  $1:10^5$  detektieren. Die Technik ist allerdings durch die begrenzte Auswahl an HCV-spezifischen HLA Klasse II Tetrameren und deren begrenzte Anwendbarkeit nur bei Patienten mit passendem HLA-Hintergrund limitiert.

Das Patientenkollektiv der Ehepartner oder Lebenspartner chronischer HCV Patienten birgt für die Durchführung und Glaubhaftigkeit der Studie einige Vorteile. Zum Einen waren die chronischen Ehepartner der exponierten Probanden regelmäßige Patienten in der Hepatitis-C-Sprechstunde, sie waren also vor der Durchführung der Studie den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe bekannt. Damit stellten auch die exponierten Ehepartner eine höchst zuverlässige Probandengruppe dar, die teilweise durch wiederholte persönliche und telefonische Gespräche Kontakt mit der Arbeitsgruppe hielt. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass die Angaben der Probanden bezüglich ihres persönlichen Risikoverhaltens wahrheitsgemäß waren. Zum Anderen konnte in diesem umschriebenen Kollektiv die potentielle Ansteckungsquelle mit HCV auf den Kontakt mit dem chronischen Ehe- beziehungsweise Lebenspartner beschränkt werden, andere Ansteckungsquellen wurden glaubhaft ausgeschlossen. Im Vergleich hierzu wäre die Zusammenarbeit mit drogenabhängigen Personen möglicherweise schwieriger geworden.

Die ersten Untersuchungen verwendeten die spezifische *ex vivo* Methode der Tetramerfärbung zur Entdeckung HCV-spezifischer Zellen bei exponierten Probanden. Mit dieser Methode ist es möglich, kleinste Populationen spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu identifizieren, welche sich insbesondere bei Personen mit HCV spontaner Ausheilung finden lassen [79] [101] [102]. Diese neue Methode ermöglicht es spezifisch die immundominanten Epitope aus dem NS 3/4 Bereich zu messen, welche als die Zielepitope bei Personen mit spontaner Ausheilung identifiziert wurden [103] [104] [105]. Direkt *ex vivo* konnten nur mit Tetrameren keine HCV spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden, entsprechend einer Frequenz von  $< 10 : 10^6$ . Durch die Einschränkung nur mit bestimmten HLA-Gruppen arbeiten zu können, war die Menge der gemessenen Probanden sehr gering, was die fehlende Signifikanz erklären könnte.

Die anschließend verwendete Methode der CD154 Aktivierungsmessung ist eine HLA unabhängige Methode, welche es ermöglichte eine *ex vivo* T-Lymphozyten Aktivierungsmessung mit einer IFN $\gamma$ -Messung zu kombinieren. Die gemessene T-Zellaktivierung auf die kumulierten Nichtstrukturproteine NS3, NS4 und NS5 gab einen starken Hinweis auf das Vorkommen HCV-spezifischer Zellen bei exponierten Personen. Das abgedeckte Proteinmuster von NS3 und NS4 gleicht den Angriffspunkten, die bei der

Ausheilung der HCV Infektion entdeckt wurden [109] [105] [50] [110]. Die Stärke der Immunaktivierung exponierter Personen war kleiner verglichen mit der Stärke HCV ausgeheilter Probanden, allerdings größer als die Aktivierung HCV chronischer Probanden. Die gemessenen Antworten sowie die IFN $\gamma$ -Messung stellten sich allerdings insgesamt sehr klein, beziehungsweise im Falle der zusätzlichen IFN $\gamma$ -Messung als nicht sicher detektierbar dar, sodass auch bei diesem Versuch davon ausgegangen werden muss, dass die hohe Selektion HCV-spezifischer aktivierter Zellen nur wenige Antworten bei exponierten Personen hervorbringt, welche nicht ausreichend ist, um zusätzlich eine funktionelle IFN $\gamma$ -Messung hervorzubringen.

Nachfolgend wurde die Proliferation CD4 $^{+}$ -T-Lymphozyten nach Antigenstimulation getestet. In mehreren Veröffentlichungen konnte gezeigt werden, dass eine frühe und starke Proliferation mit einer Ausheilung der HCV Infektion verbunden ist [111] [112] [113] [114] [96]. Interessanterweise konnten Gerlach et al. zeigen, dass sogar eine anfänglich starke CD4 Proliferation durch sukzessive Abnahme ein schnelles Wiederauftreten von HCV RNA zur Folge hat [50]. Die exponierten Probanden zeigten hier eindeutig eine Expansion der CD4 $^{+}$  Zellen auf HCV Nichtstrukturproteine nach 5-tägigem Antigenkontakt. Dieses Reaktionsmuster, welches sich auf Nichtstrukturproteine konzentrierte ähnelte wieder stark dem Reaktionsmuster spontan ausgeheilter Personen. Diese Aussicht auf proliferationsfähige T-Zellen führte zu der Durchführung 2 weiterer Zellreihen: Einmal mit Überprüfung der Funktionalität in Form von IFN $\gamma$  Produktion, sowie zur nochmaligen Messung Tetramer spezifischer Zellen. Beide Versuche waren ebenfalls höchst erfolgreich und zeigten bei HCV exponierten Personen ein signifikantes Vorkommen HCV-spezifischer Tetramer positiver Zellen, sowie eine signifikante Produktion an IFN $\gamma$  nach 14-tägiger Stimulation mit HCV-Antigenen. Somit konnte gezeigt werden, dass sich im Blut exponierter Probanden durchaus HCV-spezifische Zellen befinden, welche durch Expansion messbar sind und Effektorfunktionen erfüllen können. Ein eindeutigeres Ergebnis wäre das Vorkommen dieser Zellen im *ex vivo* Versuch und somit direkt im Blut der exponierten Personen gewesen. Anscheinend ist die Population der HCV spezifischen Zellen in diesem Zustand jedoch zu klein, als dass sie mit den verwendeten Tetramer Assays detektiert werden können. Die Tatsache, dass der CD154 Assay signifikant war gibt aber einen kleinen Hinweis auf ihre Existenz im Blut HCV exponierter Personen. Dennoch lassen sich die Ergebnisse der Tetramerezellreihen, der IFN $\gamma$  Funktionsreihen und des Proliferationsassays nicht vernachlässigen. Sie geben Grund zur Annahme, dass es durch wiederholten Kontakt geringer Virus Mengen bei exponierten Personen zur Generation eines *memory* T-Zellpools gekommen

sein könnte, welcher im Sinne einer Immunisierung fungiert und in den durchgeführten Versuchen bei Stimulation mit HCV Epitopen eine Antwort generiert hat. Verschiedene Daten, unter anderem ein von Shata et al. durchgeführter Schimpansenversuch mit wiederholten niedrigdosierten HCV-Impfungen, geben Hinweis darauf, dass es durch wiederholt kleinste Mengen von inokuliertem Virusmaterial zu einem „immune priming“, also einer Art Immunisierung, ähnlich einer Impfung kommen kann, welche das Immunsystem in ständiger Abwehrbereitschaft hält und das Individuum vor einer klinischen Infektion mit dem Virus schützt [115] [81] [90] [116]. Diese Theorie wurde bereits für das HIV aufgestellt. Verschiedene Arbeiten zu exponierten Partnern HIV-infizierter Männer beziehungsweise HIV-exponierten Prostituierten berichten von einer zellvermittelten Immunantwort in *in vitro* Versuchen gegen HIV Bestandteile [117] [118] [119].

Demnach könnte die hier gemessene HCV spezifische Immunantwort HCV exponierter Partner chronischer HCV Patienten auf eine protektive Immunität hindeuten, welche exponierte Personen durch jahrelangen Kontakt mit dem Hepatitis-C-Virus erhalten und somit vor akuter sowie chronischer Erkrankung an Hepatitis C schützt. Weitere Arbeiten auf diesem Gebiet müssen darüber Aufschluss geben, ob die in dieser Arbeit gemessene Immunantwort zuverlässig und suffizient vor einer Infektion mit HCV schützen kann, auch bei Aufnahme großer Mengen des Hepatitis-C-Virus. Zur Klärung dieser Frage soll die hier vorgestellte Studie als Ansatzpunkt einer in Hinsicht auf größere Fallzahlen ausgelegten Studie dienen. Auf dem Weg zu einem gezielten Impfstoff, der den Ausgang in eine chronische Hepatitis-C-Virusinfektion verhindern könnte, müssen unter anderem noch viele Fragen hinsichtlich der Reproduktivität der gemessenen Daten an großen Kohorten, der zeitlichen Dynamik einer wiederholten Virusexposition, der benötigten Mindestmenge an okulierte Virusmaterial sowie der Auswirkung genetischer Variationen auf den Immunschutz ermittelt werden. Die Wissenschaft steht vor einer großen Aufgabe, die bei erfolgreicher Lösung einen entscheidenden Schritt in der Bekämpfung einer der größten Infektionskrankheiten der Menschheit darstellen würde.

## 5 Zusammenfassung

### 5.1 Grundlagen und Fragestellung

Die Hepatitis-C-Viruserkrankung ist mit 170 Millionen infizierten Menschen weltweit eine der häufigsten chronischen Virusinfektionen. Sie wird durch das Hepatitis-C-Virus verursacht, ein umhülltes RNA Virus aus der Familie der Flaviviridae. Die wichtigsten Übertragungswege sind parenteral, d.h. vor der Entwicklung entsprechender Tests über Blutprodukte und heute über intravenösen Drogenkonsum. Ein wichtiger Anteil von Neuinfektionen geht aber auch auf weniger effiziente Übertragungswege wie sexuelle Übertragung oder nosokomiale Expositionen zurück. Dabei scheinen aber Risikogruppen zu existieren, welche trotz wiederholter Exposition keine manifeste HCV Infektion entwickeln und auch serologisch keine Zeichen einer durchgemachten Infektion aufweisen. Patienten, welche eine Virämie und klinische Zeichen einer HCV Infektion entwickeln, gelingt die Viruselimination nur in 15 – 30%. Unklar ist, wie hoch die Rate von Individuen ist, welche trotz einer Exposition nicht erkranken und welche immunologischen Mechanismen dafür verantwortlich sind.

Bei Patienten mit akuter Hepatitis C konnte gezeigt werden, dass eine Ausheilung der Infektion mit einer starken und anhaltenden CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort assoziiert ist. In dieser Arbeit wurde mittels einer Reihe innovativer immunologischer Techniken untersucht, ob eine solche virusspezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort auch bei Individuen nachweisbar ist, welche wiederholten Kontakt zum HCV hatten, ohne zu erkranken. Diese Untersuchung kann einen Beitrag zum Verständnis einer möglichen protektiven Immunität leisten, welche letztlich die Voraussetzung zur rationalen Entwicklung von Impfstoffen oder Immuntherapien darstellt.

Konkret wurden in dieser Arbeit die Lebenspartner von Patienten mit chronischer Hepatitis C auf ihre zelluläre Immunantwort gegenüber HCV untersucht. Nach Etablierung neuer immunologischer Techniken wurden sowohl die Stärke und die Qualität der Immunantwort mit spontan ausgeheilten und chronischen infizierten Patienten korreliert.

### 5.2 Methoden

In die Studie konnten 16 Lebenspartner chronisch mit HCV infizierter Patienten eingeschlossen werden. Als Vergleichsgruppe dienten 18 spontan ausgeheilte Patienten, 10 chronisch infizierte Patienten, sowie 14 gesunde Probanden. Es wurden zwei *ex vivo* Immunassays mit den Aktivierungsmarkern CD154 sowie CD25 neu etabliert, bei welchen PBMC der Probanden für jeweils 15 Stunden mit den Virusantigenen NS3, NS4, NS5 sowie

Core stimuliert und anschließend durchflusszytometrisch die CD154 bzw. CD25 Expression gemessen wurde. Zur Messung der antigenspezifischen CD4<sup>+</sup> Zell-Proliferation wurden die Zellen mit CFSE markiert und nach fünf Tagen durchflusszytometrisch untersucht. In Patienten mit entsprechendem HLA Klasse II Hintergrund wurden eine HLA-Klasse II Tetramer-Färbung sowohl ex-vivo als auch nach 14-tägiger antigenspezifischer Expansion durchgeführt. Die funktionelle Charakterisierung erfolgte mittels intrazellulärer Zytokinfärbung.

### 5.3 Ergebnisse

Die kumulative CD154 Aktivierung nach Stimulation mit den HCV Nichtstrukturproteinen NS3, NS4 und NS5 zeigte eine signifikant stärkere CD154 Expression auf CD4<sup>+</sup> T Zellen von HCV exponierten Probanden im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. Die stärkste Antwort ließ sich gegenüber NS3 und NS4 nachweisen. Im Vergleich zu spontan ausgeheilten Patienten war die CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort schwächer, jedoch stärker als bei Patienten mit chronischer Infektion. Gegen NS5 und Core ließ sich keine signifikante CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort nachweisen.

Die kumulative Proliferation auf NS3, NS4 und NS5, welche auch sehr kleine Precursor-Frequenzen spezifischer Zellen detektieren kann, stellte sich im Vergleich zu den gesunden Kontrollen ebenfalls signifikant stärker dar, während sich auf Core wiederum keine signifikante Proliferation messen ließ. In Individuen mit geeignetem HLA-Klasse II Genotyp ließen sich mit den in unserem Labor entwickelten HLA Klasse II Tetrameren ex vivo keine virusspezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen nachweisen (Frequenz  $<10:10^6$  CD4<sup>+</sup> T Zellen). Nach *in vitro* Expansion mit dem spezifischen Peptid gelang jedoch der eindeutige Nachweis virusspezifischer CD<sup>+</sup> T Zellen sowohl mit der HLA Klasse II Tetramer Färbung als auch mit intrazellulärer Zytokinfärbung nach Antigen-spezifischer Stimulation.

### 5.4 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass sich bei HCV exponierten Probanden eine signifikante virusspezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort nachweisen lässt. Das Profil der Epitoperkennung ähnelt den Patienten mit spontan ausgeheilter akuter Hepatitis C, ist aber quantitativ geringer, wobei zu berücksichtigen ist, dass vielleicht nicht alle unserer Probanden wirklich exponiert wurden, während die ausgeheilten Patienten alle eine nachweisliche HCV Infektion durchgemacht haben. Interessanterweise ist die HCV-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort bei den exponierten, nicht erkrankten Probanden quantitativ stärker als bei ihren chronisch Infizierten Partnern, was ein Hinweis darauf sein kann, dass diese Immunreaktion

Teil einer protektiven Immunantwort ist. Es ist anzunehmen, dass es bei diesen Personen durch den jahrelangen engen Kontakt zu ihren HCV infizierten Partnern wiederholt zu kleinsten Aufnahmen von Viruspartikel gekommen ist, welche nicht zu einer Infektion oder Serokonversion geführt haben, sehr wohl aber in der Lage waren, eine zelluläre Immunreaktion auszulösen.

Weitere Untersuchungen hierzu müssen Aufschluss darüber geben, inwieweit diese Immunreaktion Isolat-spezifisch ist oder möglicherweise einen breiteren Schutz gegenüber einer HCV Exposition darstellt, was dann einen wichtigen Beitrag für die Entwicklung eines Impfstoffes gegen HCV leisten könnte.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Choo, Q.L., et al., *Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome*. Science, 1989. **244**(4902): p. 359-62.
2. Bradley, D.W., *The agents of non-A, non-B viral hepatitis*. Journal of virological methods, 1985. **10**(4): p. 307-19.
3. Kuo, G., et al., *An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis*. Science, 1989. **244**(4902): p. 362-4.
4. Robert-Koch-Institut, *Epidemiologisches Bulletin*, 2010.
5. WHO, W.H.O.
6. WHO, W.H.O. *Hepatitis C*. 2002; Available from: <http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/whocdscsrlyo2003/en/index.html>.
7. Sharma, S.D., *Hepatitis C virus: Molecular biology & current therapeutic options*. Indian J Med Res, 2010. **131**: p. 17 - 34.
8. Kaito, M., et al., *Morphological identification of hepatitis C virus E1 and E2 envelope glycoproteins on the virion surface using immunogold electron microscopy*. Int J Mol Med, 2006. **18**(4): p. 673-8.
9. Takamizawa, A., et al., *Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers*. J Virol, 1991. **65**(3): p. 1105-13.
10. <http://www.jci.org/articles/view/39133/figure/1>.
11. Tsutsumi, T., et al., *Proteomics analysis of mitochondrial proteins reveals overexpression of a mitochondrial protein chaperon, prohibitin, in cells expressing hepatitis C virus core protein*. Hepatology, 2009. **50**(2): p. 378-86.
12. Pileri, P., et al., *Binding of hepatitis C virus to CD81*. Science, 1998. **282**(5390): p. 938-41.
13. Li, X.D., et al., *Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(49): p. 17717-22.
14. Breiman, A., et al., *Inhibition of RIG-I-dependent signaling to the interferon pathway during hepatitis C virus expression and restoration of signaling by IKKepsilon*. Journal of virology, 2005. **79**(7): p. 3969-78.
15. Foy, E., et al., *Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-I signaling*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(8): p. 2986-91.
16. Foy, E., et al., *Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease*. Science, 2003. **300**(5622): p. 1145-8.
17. Rehmann, B. and M. Nascimbeni, *Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(3): p. 215-29.
18. Behrens, S.E., L. Tomei, and R. De Francesco, *Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus*. EMBO J, 1996. **15**(1): p. 12-22.
19. Webster, D.P., et al., *Development of novel treatments for hepatitis C*. Lancet Infect Dis, 2009. **9**(2): p. 108-17.
20. Zein, N.N., *Clinical significance of hepatitis C virus genotypes*. Clin Microbiol Rev, 2000. **13**(2): p. 223-35.
21. Peter Hofmann, W., C. Sarrazin, and S. Zeuzem, *Current standards in the treatment of chronic hepatitis C*. Deutsches Arzteblatt international, 2012. **109**(19): p. 352-8.
22. Mondelli, M.U. and E. Silini, *Clinical significance of hepatitis C virus genotypes*. J Hepatol, 1999. **31 Suppl 1**: p. 65-70.

23. McOmish, F., et al., *Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: an international collaborative survey*. J Clin Microbiol, 1994. **32**(4): p. 884-92.
24. Zarkesh-Esfahani, S.H., M.T. Kardi, and M. Edalati, *Hepatitis C virus genotype frequency in Isfahan province of Iran: a descriptive cross-sectional study*. Virol J. **7**: p. 69.
25. WHO, W.H.O. *Initiative for Vaccine Research (IVR)*. 2010 08.02.2010; Available from: [http://www.who.int/vaccine\\_research/diseases/viral\\_cancers/en/index2.html](http://www.who.int/vaccine_research/diseases/viral_cancers/en/index2.html).
26. Lavie, Goffard, and Dubuisson, *Assembly of a functional HCV glycoprotein heterodimer*. Curr Issues Mol Biol, 2007. **9**(2): p. 71 - 86.
27. Dubuisson, J., F. Helle, and L. Cocquerel, *Early steps of the hepatitis C virus life cycle*. Cell Microbiol, 2008. **10**(4): p. 821-7.
28. Evans, M.J., et al., *Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry*. Nature, 2007. **446**(7137): p. 801-5.
29. Meertens, L., C. Bertaux, and T. Dragic, *Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles*. J Virol, 2006. **80**(23): p. 11571-8.
30. Blanchard, E., et al., *Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis*. J Virol, 2006. **80**(14): p. 6964-72.
31. Rehmann, B., *Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence*. J Clin Invest, 2009. **119**(7): p. 1745-54.
32. Memon, M.I. and M.A. Memon, *Hepatitis C: an epidemiological review*. J Viral Hepat, 2002. **9**(2): p. 84-100.
33. Offergeld, R., S. Ritter, and O. Hamouda, *The Risk of Transfusion Transmitted Infections - Current Aspects*. Transfus Med, 2006. **33**: p. 130 - 134.
34. Alter, M.J., *Prevention of spread of hepatitis C*. Hepatology, 2002. **36**(5 Suppl 1): p. S93-8.
35. D. Hüppe, E.Z., S. Mauss, K. Böker, *Epidemiologie der chronischen Hepatitis C in Deutschland - Eine Analyse von 10326 Hepatitis-C-Infizierten aus Schwerpunktpraxen und -ambulanzen*. Z Gastroenterol, 2007. **45**: p. 1 - 11.
36. Lamden, K.H., et al., *Hepatitis B and hepatitis C virus infections: risk factors among drug users in Northwest England*. J Infect, 1998. **37**(3): p. 260-9.
37. Terrault, N.A., *Sexual activity as a risk factor for hepatitis C*. Hepatology, 2002. **36**(5 Suppl 1): p. S99-105.
38. Orlando, R. and F. Lirussi, *Hepatitis C virus infection: sexual or non-sexual transmission between spouses? A case report and review of the literature*. Infection, 2007. **35**(6): p. 465-8.
39. Ackerman, Z., E. Ackerman, and O. Paltiel, *Intrafamilial transmission of hepatitis C virus: a systematic review*. J Viral Hepat, 2000. **7**(2): p. 93-103.
40. Soza, A., A. Riquelme, and M. Arrese, *Routes of transmission of hepatitis C virus*. Annals of hepatology : official journal of the Mexican Association of Hepatology, 2010. **9 Suppl**: p. 33.
41. Cavalheiro Nde, P., et al., *Hepatitis C: sexual or intrafamilial transmission? Epidemiological and phylogenetic analysis of hepatitis C virus in 24 infected couples*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2009. **42**(3): p. 239-44.
42. Caporaso, N., A. Ascione, and T. Stroffolini, *Spread of hepatitis C virus infection within families. Investigators of an Italian Multicenter Group*. J Viral Hepat, 1998. **5**(1): p. 67-72.
43. Tohme, R.A. and S.D. Holmberg, *Is sexual contact a major mode of hepatitis C virus transmission?* Hepatology, 2010. **52**(4): p. 1497-505.



44. Major, M.E., et al., *Hepatitis C virus kinetics and host responses associated with disease and outcome of infection in chimpanzees*. Hepatology, 2004. **39**(6): p. 1709-20.
45. Bowen, D.G. and C.M. Walker, *Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection*. Nature, 2005. **436**(7053): p. 946-52.
46. Gerlach, J.T., et al., *Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance*. Gastroenterology, 2003. **125**(1): p. 80-8.
47. Sklan, E.H., et al., *Mechanisms of HCV survival in the host*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2009. **6**(4): p. 217-27.
48. Jinushi, M., et al., *Negative regulation of NK cell activities by inhibitory receptor CD94/NKG2A leads to altered NK cell-induced modulation of dendritic cell functions in chronic hepatitis C virus infection*. J Immunol, 2004. **173**(10): p. 6072-81.
49. Urbani, S., et al., *Outcome of acute hepatitis C is related to virus-specific CD4 function and maturation of antiviral memory CD8 responses*. Hepatology, 2006. **44**(1): p. 126-39.
50. Gerlach, J.T., et al., *Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C*. Gastroenterology, 1999. **117**(4): p. 933-41.
51. Logvinoff, C., et al., *Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(27): p. 10149-54.
52. Accapezzato, D., et al., *Hepatic expansion of a virus-specific regulatory CD8(+) T cell population in chronic hepatitis C virus infection*. J Clin Invest, 2004. **113**(7): p. 963-72.
53. Hoofnagle, J.H., *Course and outcome of hepatitis C*. Hepatology, 2002. **36**(5 Suppl 1): p. S21-9.
54. Mast, E.E., M.J. Alter, and H.S. Margolis, *Strategies to prevent and control hepatitis B and C virus infections: a global perspective*. Vaccine, 1999. **17**(13-14): p. 1730-3.
55. Perz, J.F., et al., *The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide*. J Hepatol, 2006. **45**(4): p. 529-38.
56. Sharieff, K.A., D. Duncan, and Z. Younossi, *Advances in treatment of chronic hepatitis C: 'pegylated' interferons*. Cleve Clin J Med, 2002. **69**(2): p. 155-9.
57. Guo, J.T., V.V. Bichko, and C. Seeger, *Effect of alpha interferon on the hepatitis C virus replicon*. J Virol, 2001. **75**(18): p. 8516-23.
58. McHutchison, J.G., et al., *Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C*. Hepatitis Interventional Therapy Group. N Engl J Med, 1998. **339**(21): p. 1485-92.
59. Zeuzem, S., *Clinical implications of hepatitis C viral kinetics*. J Hepatol, 1999. **31** Suppl 1: p. 61-4.
60. Foster, G.R., *Pegylated interferons for the treatment of chronic hepatitis C: pharmacological and clinical differences between peginterferon-alpha-2a and peginterferon-alpha-2b*. Drugs. **70**(2): p. 147-65.
61. FDA. 2011 13.05.2011; Available from: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm255390.htm>.
62. Sherman, K.E., et al., *Response-guided telaprevir combination treatment for hepatitis C virus infection*. The New England journal of medicine, 2011. **365**(11): p. 1014-24.
63. Sarrazin, C., et al., *[Expert opinion on boceprevir- and telaprevir-based triple therapies of chronic hepatitis C]*. Zeitschrift fur Gastroenterologie, 2012. **50**(1): p. 57-72.
64. Scognamiglio, P., et al., *Presence of effector CD8+ T cells in hepatitis C virus-exposed healthy seronegative donors*. J Immunol, 1999. **162**(11): p. 6681-9.
65. Kamal, S.M., et al., *Cellular immune responses in seronegative sexual contacts of acute hepatitis C patients*. J Virol, 2004. **78**(22): p. 12252-8.

66. Frentsch, M., et al., *Direct access to CD4+ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression*. Nat Med, 2005. **11**(10): p. 1118-24.
67. Chattopadhyay, P.K., J. Yu, and M. Roederer, *Live-cell assay to detect antigen-specific CD4+ T-cell responses by CD154 expression*. Nat Protoc, 2006. **1**(1): p. 1-6.
68. van Kooten, C. and J. Banchereau, *CD40-CD40 ligand*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(1): p. 2-17.
69. Lamoreaux, L., M. Roederer, and R. Koup, *Intracellular cytokine optimization and standard operating procedure*. Nat Protoc, 2006. **1**(3): p. 1507-16.
70. Rea, I.M., S.E. McNerlan, and H.D. Alexander, *CD69, CD25, and HLA-DR activation antigen expression on CD3+ lymphocytes and relationship to serum TNF-alpha, IFN-gamma, and sIL-2R levels in aging*. Experimental gerontology, 1999. **34**(1): p. 79-93.
71. Theze, J., P.M. Alzari, and J. Bertoglio, *Interleukin 2 and its receptors: recent advances and new immunological functions*. Immunology today, 1996. **17**(10): p. 481-6.
72. Diepolder, H.M., et al., *Different levels of T-cell receptor triggering induce distinct functions in hepatitis B and hepatitis C virus-specific human CD4(+) T-cell clones*. J Virol, 2001. **75**(17): p. 7803-10.
73. Ulsenheimer, A., et al., *Detection of functionally altered hepatitis C virus-specific CD4 T cells in acute and chronic hepatitis C*. Hepatology, 2003. **37**(5): p. 1189-98.
74. Quah, B.J., H.S. Warren, and C.R. Parish, *Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*. Nat Protoc, 2007. **2**(9): p. 2049-56.
75. Lyons, A.B., *Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution*. Journal of immunological methods, 2000. **243**(1-2): p. 147-54.
76. Hawkins, E.D., et al., *Measuring lymphocyte proliferation, survival and differentiation using CFSE time-series data*. Nature protocols, 2007. **2**(9): p. 2057-67.
77. Lyons, A.B. and C.R. Parish, *Determination of lymphocyte division by flow cytometry*. J Immunol Methods, 1994. **171**(1): p. 131-7.
78. Schroder, K., et al., *Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(2): p. 163-89.
79. Scriba, T.J., et al., *Ultrasensitive detection and phenotyping of CD4+ T cells with optimized HLA class II tetramer staining*. Journal of immunology, 2005. **175**(10): p. 6334-43.
80. Koziel, M.J., et al., *Hepatitis C virus-specific cytolytic T lymphocyte and T helper cell responses in seronegative persons*. The Journal of infectious diseases, 1997. **176**(4): p. 859-66.
81. Thuraiajah, P.H., et al., *Hepatitis C virus (HCV)--specific T cell responses in injection drug users with apparent resistance to HCV infection*. The Journal of infectious diseases, 2008. **198**(12): p. 1749-55.
82. Farci, P., et al., *Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus*. Science, 1992. **258**(5079): p. 135-40.
83. Prince, A.M., et al., *Immunity in hepatitis C infection*. The Journal of infectious diseases, 1992. **165**(3): p. 438-43.
84. Okamoto, H., et al., *Superinfection of chimpanzees carrying hepatitis C virus of genotype II/1b with that of genotype III/2a or I/1a*. Hepatology, 1994. **20**(5): p. 1131-6.
85. Prince, A.M., et al., *Protection against chronic hepatitis C virus infection after rechallenge with homologous, but not heterologous, genotypes in a chimpanzee model*. The Journal of infectious diseases, 2005. **192**(10): p. 1701-9.

86. Bukh, J., et al., *Previously infected chimpanzees are not consistently protected against reinfection or persistent infection after reexposure to the identical hepatitis C virus strain*. Journal of virology, 2008. **82**(16): p. 8183-95.
87. Bassett, S.E., et al., *Protective immune response to hepatitis C virus in chimpanzees rechallenged following clearance of primary infection*. Hepatology, 2001. **33**(6): p. 1479-87.
88. Mehta, S.H., et al., *Protection against persistence of hepatitis C*. Lancet, 2002. **359**(9316): p. 1478-83.
89. De Mitri, M.S., et al., *New infection with heterotypic hepatitis C virus in a patient with long-term hepatitis C virus eradication*. Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver, 2001. **33**(7): p. 591-4.
90. Thomas, D.L., et al., *Correlates of hepatitis C virus infections among injection drug users*. Medicine, 1995. **74**(4): p. 212-20.
91. Warshow, U.M., et al., *Cytokine profiles in high risk injection drug users suggests innate as opposed to adaptive immunity in apparent resistance to hepatitis C virus infection*. Journal of viral hepatitis, 2012. **19**(7): p. 501-8.
92. Zeremski, M., et al., *Hepatitis C virus-specific T-cell immune responses in seronegative injection drug users*. Journal of viral hepatitis, 2009. **16**(1): p. 10-20.
93. Kubitschke, A., et al., *Induction of hepatitis C virus (HCV)-specific T cells by needle stick injury in the absence of HCV-viraemia*. European journal of clinical investigation, 2007. **37**(1): p. 54-64.
94. Bronowicki, J.P., et al., *Lymphocyte reactivity to hepatitis C virus (HCV) antigens shows evidence for exposure to HCV in HCV-seronegative spouses of HCV-infected patients*. The Journal of infectious diseases, 1997. **176**(2): p. 518-22.
95. Bengsch, B., R. Thimme, and H.E. Blum, *Role of host genetic factors in the outcome of hepatitis C virus infection*. Viruses, 2009. **1**(2): p. 104-25.
96. Smyk-Pearson, S., et al., *Spontaneous recovery in acute human hepatitis C virus infection: functional T-cell thresholds and relative importance of CD4 help*. Journal of virology, 2008. **82**(4): p. 1827-37.
97. Folgori, A., et al., *Early impairment of hepatitis C virus specific T cell proliferation during acute infection leads to failure of viral clearance*. Gut, 2006. **55**(7): p. 1012-9.
98. Rosen, H.R., et al., *Frequencies of HCV-specific effector CD4+ T cells by flow cytometry: correlation with clinical disease stages*. Hepatology, 2002. **35**(1): p. 190-8.
99. Freeman, A.J., et al., *Prevalence of production of virus-specific interferon-gamma among seronegative hepatitis C-resistant subjects reporting injection drug use*. The Journal of infectious diseases, 2004. **190**(6): p. 1093-7.
100. Mizukoshi, E., et al., *Hepatitis C virus (HCV)-specific immune responses of long-term injection drug users frequently exposed to HCV*. The Journal of infectious diseases, 2008. **198**(2): p. 203-12.
101. Day, C.L., et al., *Ex vivo analysis of human memory CD4 T cells specific for hepatitis C virus using MHC class II tetramers*. The Journal of clinical investigation, 2003. **112**(6): p. 831-42.
102. Lucas, M., et al., *Tracking virus-specific CD4+ T cells during and after acute hepatitis C virus infection*. PloS one, 2007. **2**(7): p. e649.
103. Gerlach, J.T., et al., *Minimal T-cell-stimulatory sequences and spectrum of HLA restriction of immunodominant CD4+ T-cell epitopes within hepatitis C virus NS3 and NS4 proteins*. Journal of virology, 2005. **79**(19): p. 12425-33.
104. Schulze zur Wiesch, J., et al., *Broad repertoire of the CD4+ Th cell response in spontaneously controlled hepatitis C virus infection includes dominant and highly promiscuous epitopes*. Journal of immunology, 2005. **175**(6): p. 3603-13.

105. Diepolder, H.M., et al., *Immunodominant CD4+ T-cell epitope within nonstructural protein 3 in acute hepatitis C virus infection*. Journal of virology, 1997. **71**(8): p. 6011-9.
106. Campbell, K.A., et al., *CD40 ligand is required for protective cell-mediated immunity to Leishmania major*. Immunity, 1996. **4**(3): p. 283-9.
107. Kamanaka, M., et al., *Protective role of CD40 in Leishmania major infection at two distinct phases of cell-mediated immunity*. Immunity, 1996. **4**(3): p. 275-81.
108. Stout, R.D., et al., *Impaired T cell-mediated macrophage activation in CD40 ligand-deficient mice*. Journal of immunology, 1996. **156**(1): p. 8-11.
109. Diepolder, H.M., et al., *Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection*. Lancet, 1995. **346**(8981): p. 1006-7.
110. Al-Sherbiny, M., et al., *Exposure to hepatitis C virus induces cellular immune responses without detectable viremia or seroconversion*. The American journal of tropical medicine and hygiene, 2005. **73**(1): p. 44-9.
111. Thimme, R., et al., *Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection*. The Journal of experimental medicine, 2001. **194**(10): p. 1395-406.
112. Missale, G., et al., *Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response*. The Journal of clinical investigation, 1996. **98**(3): p. 706-14.
113. Chang, K.M., et al., *Differential CD4(+) and CD8(+) T-cell responsiveness in hepatitis C virus infection*. Hepatology, 2001. **33**(1): p. 267-76.
114. Semmo, N., et al., *Analysis of the relationship between cytokine secretion and proliferative capacity in hepatitis C virus infection*. Journal of viral hepatitis, 2007. **14**(7): p. 492-502.
115. Shata, M.T., et al., *Exposure to low infective doses of HCV induces cellular immune responses without consistently detectable viremia or seroconversion in chimpanzees*. Virology, 2003. **314**(2): p. 601-16.
116. Della Bella, S., et al., *Hepatitis C virus-specific reactivity of CD4+-lymphocytes in children born from HCV-infected women*. Journal of hepatology, 2005. **43**(3): p. 394-402.
117. Clerici, M., et al., *Cell-mediated immune response to human immunodeficiency virus (HIV) type 1 in seronegative homosexual men with recent sexual exposure to HIV-1*. The Journal of infectious diseases, 1992. **165**(6): p. 1012-9.
118. Rowland-Jones, S., et al., *HIV-specific cytotoxic T-cells in HIV-exposed but uninfected Gambian women*. Nature medicine, 1995. **1**(1): p. 59-64.
119. Fowke, K.R., et al., *Resistance to HIV-1 infection among persistently seronegative prostitutes in Nairobi, Kenya*. Lancet, 1996. **348**(9038): p. 1347-51.

*Die Daten der Arbeit wurden im Rahmen des jährlichen Treffens der American Association for the Study of Liver Diseases, AASLD, in Boston 2010 vorgestellt.*

## 7 Anhang

### 7.1 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Helmut Diepolder, Chefarzt der Medizinischen Klinik des Klinikums Kaufbeuren und Arbeitsgruppenleiter im Institut für Immunologie der Ludwig-Maximilians-Universität, sowohl für die Überlassung des Themas, als auch für die Möglichkeit der Durchführung der Arbeit in seiner Arbeitsgruppe sowie für die tatkräftige Betreuung und Hilfe bei allen Fragen bezüglich der Arbeit.

Mein großer Dank gilt auch Dr. med. Bijan Raziorrouh, Assistenzarzt der Medizinischen Klinik und Poliklinik II des Klinikums Großhadern und Postdoktorand in der Arbeitsgruppe von Prof. Diepolder, für die stete Hilfsbereitschaft und Zuverlässigkeit, die er mir bei der Mitbetreuung der Arbeit entgegen brachte.

Sehr bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern des Labors im Institut für Immunologie der LMU. Hier danke ich besonders Frau Julia Bayerl und Frau Britta Albertzarth, für die herzliche Aufnahme in das Team, die hervorragende technische Einarbeitung und die konstante Begleitung bei der Durchführung der Experimente. Ohne ihre Hilfe wäre die Arbeit nur halb so erfolgreich und die Zeit im Labor nur einen Bruchteil so angenehm gewesen wie ich sie erlebt habe.

Schlussendlich gilt mein Dank all den Personen, die mit der Durchsicht und Korrektur der Arbeit mit ihren vielen wertvollen Hinweisen zur Vollendung beigetragen haben. Insbesondere meiner Tante, Eva Oberdorf für ihren Blick auf das Förmliche und Frau Sarah Mavi für ihren Blick auf das Inhaltliche – ich hoffe ich kann Euch diese Stunden irgendwann zurück zahlen. Vielen Dank für die vielen aufmunternden Worte! Meinem Freund, Herrn Oliver Baron, danke ich für die Unterstützung, die er mir auf dem gesamten langen Weg entgegengebracht hat, mich immer wieder ermutigt hat weiterzumachen, meine wechselnden Launen ertragen und mich stets ermutigt hat nach vorne zu schauen. Ohne Dich hätte ich es nicht zu Ende geschafft – Du bist ein Schatz. Ganz besonders möchte ich meinen Eltern, meiner Schwester und meiner Tante danken für ihre stete Unterstützung durch mein gesamtes Studium, immer ein offenes Ohr für all meine Belange gehabt und mich in hellen und dunklen Zeiten getragen zu haben. Ich bin unendlich dankbar Euch als Familie bekommen zu haben - wer auch immer dafür verantwortlich ist hat es gut mit mir gemeint! Diese Arbeit ist auch eure Arbeit!